

MEDICINSKI FAKULTET

Ana Boban

**Metabolizam kosti u bolesnika s
hemofilijom**

DISERTACIJA

Zagreb, 2011.

Disertacija je izrađena u Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti
Kliničkog bolničkog centra Zagreb

Voditelj rada: prof. dr. sc. Silva Zupančić-Šalek

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1 Hemofilija	3
1.1.1 Definicija.....	3
1.1.2 Hemofilija A.....	4
1.1.3 Hemofilija B.....	4
1.1.4 Klasifikacija hemofilija.....	5
1.1.5 Kliničke karakteristike hemofilije.....	6
1.1.6 Dijagnoza hemofilije.....	7
1.1.7 Liječenje hemofilije.....	8
1.1.8 Komplikacije liječenja hemofilije	9
1.2. GRAĐA I METABOLIZAM KOSTI.....	11
1.2.1. Građa kosti	11
1.2.2 Koštana pregradnja.....	12
1.2.3 Utjecaj inaktivnosti na metabolizam kosti	13
1.3 DOSADAŠNJA ISTRAŽIVANJA O KOŠTANOJ PREGRADNJI I MINERALNOJ GUSTOĆI KOSTI U BOLESNIKA S HEMOFILIJOM	14
2. HIPOTEZA I CILJEVI	17
Hipoteza	17
Opći cilj istraživanja	18
Specifični ciljevi istraživanja	18
Znanstveni doprinos	18
3. ISPITANICI I METODE	19
3.1 Ispitanici	19
3.2 Mjerenje mineralne gustoće kosti	20
3.3 Mjerenje kvantitativnog ultrazvuka petne kosti.....	20
3.4 Biokemijske metode.....	21
3.5 Procjena fizičke aktivnosti	22
3.6 Statističke metode	22
4. REZULTATI	23
4.1 Osnovne karakteristike bolesnika	23
4.2 Rezultati mjerenja mineralne gustoće kosti pomoću denzitometrije	26

4.3 Rezultati mjerenja kvantitativnog ultrazvuka petne kosti.....	35
4.4 Rezultati analize biljega koštane pregradnje.....	42
4.5 Usporedba rezultata koštanog statusa denzitometrije i kvantitativnog ultrazvuka petne kosti	47
RASPRAVA	53
ZAKLJUČCI.....	62
SAŽETAK.....	64
SUMMARY	66
LITERATURA.....	67
ŽIVOTOPIS	75

POPIS SKRAĆENICA

aPCC	aktivirani koncentrat protrombinskog kompleksa (prema engl. <i>activated prothrombin complex concentrate</i>)
BMD	mineralna gustoća kosti (prema engl. <i>bone mineral density</i>)
BMI	indeks tjelesne mase (prema engl. <i>body mass index</i>)
BU	Bethesda jedinica (prema engl. <i>Bethesda units</i>)
BUA	slabljenje ultrazvučnog vala pri prolasku kroz kost (prema engl. <i>broadband ultrasound attenuation</i>)
CMV	citomegalovirus
DXA	dvoenergetska apsorpciometrija x zraka (prema engl. <i>dual energy x-ray absorptiometry</i>)
FVIII	faktor VIII
FIX	faktor IX
HAART	antiretrovirusna terapija (prema engl. <i>Highly Active AntiRetroviral Treatment</i>)
Hip	proksimalni dio bedrene kosti (engl.)
HIV	virus humane imunodeficijencije
HCV	virus hepatitisa C
Inter	intertrohanterični dio bedrene kosti
IR	interkvartilni raspon
K-AP	koštana alkalna fosfataza
L1-L4	lumbalna kralježnica, od prvog do četvrtog lumbalnog kralješka
M-CSF	faktor stimulacije rasta kolonija makrofaga (prema engl. <i>macrophage colony stimulating factor</i>)
Neck	vrat bedrene kosti (engl.)

OPG	osteoprotegerin
PTH	paratiroidni hormon
QUI	indeks kvantitativnog ultrazvuka (prema engl. <i>quantitative ultrasound index</i>)
QUS	kvantitativni ultrazvuk (prema engl. <i>quantitative ultrasound</i>)
RANK	receptor za aktivaciju jezgrenog faktora kapa-B (prema engl. <i>receptor activator of nuclear factor κ-B</i>)
RANK-L	ligand receptora za aktivaciju jezgrenog faktora kapa-B (prema engl. <i>receptor activator of nuclear factor κ-B ligand</i>)
rFVIIa	aktivirani rekombinantni faktor VII
SOS	brzina ultrazvučnog vala (prema engl. <i>speed of sound</i>)
25-OHD	25-hidroksi vitamin D

1. UVOD

1.1 Hemofilija

1.1.1 Definicija

Hemofilija je rijedak nasljedni poremećaj zgrušavanja. Osnovne karakteristike bolesti su spontana krvarenja u mišiće i zglobove, te produžena i pojačana posttraumatska krvarenja. Postoji nekoliko oblika hemofilije, a najčešće se javljaju hemofilija A i hemofilija B koje se klinički međusobno ne mogu razlikovati. Hemofiliju A uzrokuje manjak funkcionalnog faktora VIII, a hemofiliju B faktora IX. Hemofilija A i hemofilija B su opisane u svim etničkim grupama i dijelovima svijeta (Mannucci, 2002.). Hemofilija C je vrlo rijetka, a karakterizira ju manjak faktora XI. Javlja se gotovo isključivo kod Židova, te najčešće uzrokuje blagu sklonost krvarenju (Seligsohn, 1978). Procjenjuje se da hemofilija A ima incidenciju oko 1 na 10 000 rođene muške djece, dok je hemofilija B rjeđa, te se javlja jednom na 60 000 rođene muške djece (Mannucci, 2002.). Hemofilija time ima kriterije za uvrštavanje u skupinu rijetkih bolesti.

Nasljeđuje se recesivno, spolno vezano, tako da obolijevaju muškarci, dok su žene nosioci bolesti. Žene također mogu imati blagi oblik bolesti, iako rijetko. U otprilike 30% bolesnika hemofilija nije naslijeđena, već je javlja kao posljedica novonastale mutacije u genu za faktor VIII ili IX (Kerr, 1965.).

Prvi opisi poremećaja krvarenja koji bi mogli odgovarati hemofiliji su pronađeni u Babilonskom Talmudu (4. st. prije Krista), te u židovskim spisima iz 2. st. prije Krista. U srednjem vijeku je arapski liječnik Albucasis (Abdul El Kassam) opisao obitelj u kojoj su muškarci umirali od krvarenja nakon manjih ozlijeđa. 1803. godine je liječnik John Conrad Otto prvi puta dao suvremeni opis hemofilije kada opisuje tri osnovne karakteristike bolesti; nasljednu sklonost muškaraca krvarenju. Ime «hemofilija» prvi puta spominje Hopff 1928. godine.

1.1.2 Hemofilija A

Hemofilija A je, nakon von Willebrandove bolesti, drugi najčešći nasljedni poremećaj zgrušavanja. Na nju otpada 80-85% svih slučajeva hemofilije. Hemofiliju A karakterizira smanjena koncentracija funkcionalnog faktora VIII (FVIII) u cirkulaciji. Smanjena aktivnost FVIII može biti posljedica smanjene količine FVIII ili sinteze funkcionalno abnormalnog FVIII (Mannucci, 2002.).

Faktor VIII je glikoprotein veličine 320 kD (Fang, 2007.). Sintetizira se u jetri, u stanicama retikuloendotelnog sustava. U plazmi se nalazi u koncentraciji od 0,1-0,2 mcg/mL i vezan je za von Willebrandov faktor koji ga stabilizira. Faktor VIII ima važnu ulogu u formaciji ugruška. U nedostatku funkcionalnog FVIII stvaranje ugruška je odgođeno zbog smanjenog stvaranja trombina.

Gen za FVIII je građen od 186 kilobaza s 26 eksona, što ga čini jednim od najvećih gena otkrivenih u ljudi. Nalazi se na dugom kraku X kromosoma (q28) u najdistalnijoj pruzi. Gen je kloniran i sekvencioniran 1984. godine, što je omogućilo identifikaciju brojnih mutacija u genu koje uzrokuju hemofiliju. Najčešća mutacija u bolesnika s hemofilijom A je intrakromosomska rekombinacija, inverzija introna 22 (De Brasi, 2008.). Ova mutacija je opisana u 50% bolesnika s teškim oblikom hemofilije. U ostalih bolesnika s teškim oblikom hemofilije prevladavaju velike delacije gena. S druge strane, u većine bolesnika s blagim i umjerenim oblikom hemofilije su otkrivene pojedinačne točkaste mutacije koje dovode do besmislene poruke u sekvenci. Broj opisanih mutacija gena za FVIII i dalje raste. Opisane su i dvostruke mutacije u istog bolesnika (Shetty S, 2011.).

1.1.3 Hemofilija B

Hemofilija B se još naziva i Christmasova bolest, prema imenu obitelji u kojoj je prvi puta opisana. Javlja se rjeđe od hemofilije A, a karakterizira ju manjak funkcionalnog faktora IX.

Faktor IX je jednolančani glikoprotein ovisan o vitaminu K građen od 415 aminokiselina. Njegova uloga je uz FVIII također važna u stvaranju ugruška (Lillicrap, 1998.).

Gen za faktor IX se nalazi na dugom kraku kromosoma X. Građen je od 33 kb, dakle je mnogo manji od gena za faktor VIII. Opisane su brojne mutacije u genu za faktor IX, uključujući preko 40 delecija i više od 500 zamjene aminokiselina. Više od 30% mutacije uzrokuje sintezu afunkcionalnog faktora IX.

Poseban oblik hemofilije B nastaje mutacijom promotorske regije gena za faktor IX i naziva se hemofilija B Leiden. Ime je dobila prema gradu u Njemačkoj gdje je prvi puta opisana. Ovaj specifični poremećaj karakterizira vrlo niska koncentracija faktora IX kod rođenja i tijekom ranog djetinjstva, te postupni spontani porast koncentracije FIX i do 60% vrijednosti normale tijekom puberteta. Vjeruje se da koncentracija FIX postupno raste djelovanjem androgena.

1.1.4 Klasifikacija hemofilija

Hemofilija se prema razini faktora koji nedostaje u plazmi klasificira kao teška, umjerena i blaga. Definiciju je postavilo Internacionalno društvo za trombozu i hemostazu (International Society for Thrombosis and Haemostasis, White GC, 2000.). Temeljem razine faktora možemo pretpostaviti klinički tijek bolesti, odnosno težinu i učestalost krvarenja.

Teški oblik bolesti dakle definira aktivnost faktora VIII ili IX koja je manja od 1%. Bolesnici s teškim oblikom hemofilije krvare spontano i često u zglobove i mišiće, a rjeđe u ostala meka tkiva i tjelesne šupljine. Osim intrakranijskih krvarenja, nagle smrti zbog krvarenja su rijetke. Pojedini bolesnici s razinom faktora VIII ili IX manjim od 1% mogu imati vrlo blagu kliničku sliku. U dijela ovih bolesnika može se otkriti mutacija za faktor V Leiden koja djeluje protrombotički (Franchini M, 2010.), međutim u ostalih bolesnika blaga klinička slika ostaje nerazjašnjena.

Bolesnici s umjerenim oblikom bolesti imaju razinu faktora FVIII ili IX od 1-5%, te krvare rjeđe od bolesnika s teškom hemofilijom, iako se krvarenja mogu javiti spontano i nakon traume.

Blagi oblik bolesti imaju bolesnici s razinom faktora FVIII ili IX većom od 5%, i oni krvare rijetko. Krvarenja se najčešće javljaju uz traumu ili operaciju, a spontana krvarenja se u pravilu ne javljaju.

1.1.5 Kliničke karakteristike hemofilije

Klinička slika hemofilije ovisi o stupnju bolesti, te je jednaka u bolesnika s hemofilijom A i hemofilijom B.

Osnovne značajke hemofilije A i B su nastanak spontanih krvarenja u velike mišiće i zglobove, te pojačana i produžena krvarenja nakon traume ili operativnog zahvata. Osim u zglobove i mišiće, krvarenja se u bolesnika s hemofilijom mogu javiti i u visceralne organe i tjelesne šupljine. Krvarenja u središnji živčani sustav mogu biti fatalna. U bolesnika s hemofilijom je primarna hemostaza uredna, te najčešće ne dolazi do produženog ili pojačanog krvarenja nakon manjih ozljeda kože ili sluznica.

Hemofilija se klinički najčešće manifestira krajem prve godine djetetova života kada ono počinje puzati i hodati, te se nakon manjih trauma javljaju krvarenja u mišiće i zglobove. Prvo krvarenje se također može javiti nakon intramuskularne injekcije ili nakon cirkumcizije ili drugog operativnog zahvata.

Od svih krvarenja u bolesnika s hemofilijom, najčešća su ona u velike zglobove, te čine čak do 75% svih krvarenja. Najčešće se krvarenja javljaju u koljenima, laktovima, gležnjevima i ručnom zglobu.

Krvarenja u mišiće su vrlo česta nakon traume, ali se mogu javiti i spontano. Za hemofiliju su tipična krvarenja u mišić iliopsoas koja mogu dovesti do kompresije femoralnog živca. Ovo krvarenje nastaje spontano, a očituje se jakim bolovima u preponi uz fleksiju u zglobu kuka te ponekad palpabilnog rezistencijom. Ukoliko je zahvaćen femoralni živac bolesnik će se žaliti na nedostatak osjeta od između prepona i koljena.

Opetovana krvarenja u isti zglob dovode do kroničnih ireverzibilnih promjena zgloba koje završavaju nastankom hemofilične artropatije. Hemofiličnu artropatiju karakteriziraju kronični proliferativni sinovitis i destrukcija hrskavice koji nastaju kao posljedica opetovane ektravazacije krvi u zglobni prostor. Točan mehanizam

nastanka ovih promjena nije poznat, međutim se smatra da odlaganje željeza u prostor zgloba ima centralnu ulogu. Željezo potiče apoptozu hondrocita, te potiče proliferaciju sinovijalne membrane indukcijom protoonkogeni koji sudjeluju u staničnom ciklusu, stimulacijom upalnih citokina i kočenjem apoptoze (Lafeber FP, 2008.).

Klinički, hemofiličnu artropatiju karakterizira ukočenost zgloba, smanjena pokretljivost i kronična bol. U najtežim slučajevima može doći do ankiloze zgloba, te on postaje nefunkcionalan. Hemofilična artropatija uzrokuje razvoj invalidnosti, ograničava pokretnost bolesnika, te bitno smanjuje kvalitetu života bolesnika.

Krvarenja se u bolesnika s hemofilijom najčešće ponavljaju u isti zglob ili nekoliko zglobova, koji uslijed oštećenja i kroničnih promjena postaju osjetljivi za nova krvarenja. Ovi zglobovi postaju kronično promijenjeni i nazivaju se ciljnim zglobovima.

Opasna, ali rijetka komplikacija krvarenja u bolesnika s teškom hemofilijom je nastanak koštanih cisti i pseudotumora. Pseudotumori nastaju u 1-2% bolesnika s teškom hemofilijom i posljedica su neadekvatne terapije opetovanih krvarenja u mišiće. Svojim rastom ciste i pseudotumori mogu činiti pritisak ili uništavati okolne strukture, te ih je tada potrebno liječiti, konzervativno, zračenjem ili kirurški (D'Young, 2009).

U manjeg dijela bolesnika s hemofilijom težina kliničke slike ne odgovara stupnju razine aktivnosti faktora. U tih je bolesnika broj spontanih krvarenja relativno malen unatoč aktivnosti FVIII <1%. U dijela ovih bolesnika je uz hemofiliju dokazana i nasljedna trombofilija (Nowak-Gottl U, 2003.).

1.1.6 Dijagnoza hemofilije

Dijagnoza hemofilije se postavlja određivanjem razine aktivnosti faktora VIII i IX. Na hemofiliju se može posumnjati temeljem kliničke slike, produženog aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena, te na temelju obiteljske anamneze. Mjerenjem razine faktora VIII i IX možemo odrediti tip i težinu hemofilije. U bolesnika s negativnom obiteljskom anamnezom potrebno je isključiti

tip 3 Willebrandove bolesti, koja će se također prezentirati sniženom aktivnosti FVIII i kliničkom slikom spontanog krvarenja (Hampshire, 2011.).

Danas je moguća i prenatalna dijagnostika biospijom korionskih resica u 12 tjednu trudnoće (Peyvandi, 2006.).

1.1.7 Liječenje hemofilije

Hemofiliju nije moguće izliječiti. Cilj liječenja hemofilije je prevenirati i zaustaviti akutne epizode krvarenja, minimalizirati komplikacije akutnog krvarenja, te održati normalnu funkciju zglobova.

U liječenju se koriste koncentрати faktora VIII i IX, te dezmopresin. Dezmopresin se koristi u liječenju blagih oblika hemofilije A. Odgovor na terapiju dezmopresinom je potrebno procijeniti kod svakog bolesnika prije planiranja terapije. Koncentрати faktora mogu biti dobiveni rekombinantnim tehnikama ili izolacijom iz ljudske plazme. Prednost rekombinantnih faktora je u tome što zbog načina proizvodnje ne nose rizik prijenosa infekcija, dok međutim s druge strane proces proizvodnje rekombinantnim tehnikama povećava cijenu lijeka. Koncentрати faktora dobiveni iz plazme obrađuju se s najmanje dvije procedure inaktivacije virusa, uz testiranje plazme na prisutnost virusa, što minimalizira rizik prijenosa infekcija (Mannucci, 2002.).

Koncentrat faktora se može primjenjivati epizodno u slučaju akutnog krvarenja, preventivno u slučaju aktivnosti koja nosi povećani rizik krvarenja, te profilaktički. Cilj profilaktičkog liječenja je trajno održavanje razine faktora $>1\%$, što značajno smanjuje rizik nastanka spontanih krvarenja, a postiže se redovitom primjenom faktora u pravilnim intervalima. Primarna profilaksa počinje u ranom djetinjstvu, prije prvog krvarenja u zglob. Sekundarnom profilaksom se naziva ona koja počinje nakon epizode krvarenja u zglob. Primjena profilaktičkog liječenja se pokazala učinkovitom u prevenciji razvoja hemofilične artropatije (Manco-Johnson MJ, 2007, Berntorp E, 2010).

Kvalitetu života bolesnika s hemofilijom je unaprijedila primjena kućne terapije. Bolesnici se educiraju prepoznati indikaciju i sami primijeniti koncentrat faktora, te lijek imaju kod kuće. Time je omogućena primjena lijeka unutar 2 sata od

početka krvarenja. Rano zaustavljanje krvarenja je povezano s dugoročnim poboljšanjem kvalitete života bolesnika s hemofilijom (Teitel JM, 2004.).

1.1.8 Komplikacije liječenja hemofilije

Nakon što je rizik prijenosa infekcija koncentratima faktora postao minimalan, najteža komplikacija liječenja hemofilije je postao razvoj protutijela na faktor VIII i IX. Protutijela na faktor VIII i IX se javljaju kao imunološki odgovor organizma na egzogeni faktor VIII odnosno faktor IX. U teškom obliku hemofilije A se javljaju u oko 20-30% bolesnika, a u hemofiliji B u 1-5% bolesnika (Franchini, 2009.). Prisutnost protutijela se dokazuje Nijemegenovom modifikacijom Bethesda metode. Titar od 5 Bethesda jedinica (BU) se smatra granicom protutijela niskog i visokog titra (Ananyeva, 2009.). Ako su niskog titra često su prolazna, te ih se primjenom visokih doza koncentrata faktora može eradicirati (Bolton-Maggs PHB, 2003., Teitel, 2007.). S druge strane, bolesnici s visokim titrom protutijela na primjenu koncentrata faktora reagiraju daljnjim porastom titra. Sklonost bolesnika da razviju protutijela na faktor VIII ili IX ovise o složenoj interakciji genetskih čimbenika, individualnog imunološkog odgovora, te načinu i obliku primjene koncentrata faktora (Coppola, 2010.). Budući protutijela inaktiviraju biološko djelovanje faktora VIII i IX, liječenje bolesnika s visokim titrom protutijela se provodi koncentratima faktora koji zaobilaze faktor VIII ili IX, a to su aktivirani koncentrat protrombinskog kompleksa (FEIBA) i aktivirani rekombinantni faktor VII (DiMichele, 2002., Treur, 2009.). Usprkos njihovoj djelotvornosti, koncentрати faktora koji zaobilaze djelovanje faktora VIII i IX ne postižu hemostazu jednako učinkovito kao koncentрати faktora u bolesnika bez protutijela (Astermark J, 2010.). Stoga je u bolesnika s pozitivnim protutijelima u akutnom krvarenju lijek potrebno primijeniti u što kraćem roku (ZS. Salek, 2011.). Bolesnici s pozitivnim protutijelima na FVIII imaju teži stupanj artropatije, te nižu kvalitetu života od bolesnika bez prisutnih protutijela (Morfini, 2007.). Izlječenje, odnosno eradikacija protutijela na faktor VIII ili IX je moguća primjenom terapijom imunosne tolerancije (engl. *Immune Tolerance Therapy*, ITI) (DiMichele D. H., 2007.).

Koncentratima faktora dobivenih iz ljudske plazme mogu se prenijeti virusi hepatitisa A, B, C, D i E, te HIV, Epstein-Barrov virus, CMV, Parvovirus B19, toksoplazmoza i malarija (Burnouf, 2000.). Rizik prijenosa infekcija koncentratima faktora dobivenim iz ljudske plazme je danas minimaliziran tehnikama inaktivacije virusa i te molekularnim metodama testiranja na prisutnost virusa (Jorquera, 2007., Kasper, 2002.). Međutim, hepatitis C je i dalje vodeći uzrok kroničnog hepatitisa i jedna od najtežih komplikacija liječenja hemofilije. Većina bolesnika inficirana virusom hepatitisa C ostaje asimptomatska. Međutim, obzirom na mogućnost razvoja jetrenom zatajenja i hepatocelularnog karcinoma, liječenje je indicirano u svih bolesnika s verificiranim kroničnim hepatitisom C. Izlječenje se ovsino o genotipu postiže u 40-90% bolesnika s hemofilijom (Patel, 2009.). Prva transplantacija jetre u bolesnika s hemofilijom je učinjena 1985.godine u 15-godišnjeg dječaka (Lewis, 1985.). Danas je transplantacija jetre izbor liječenja u bolesnika s hemofilijom i terminalnim zatajenjem jetre. Rezultati transplantacije jetre u bolesnika s hemofilijom su usporedivi s preživljenjem bolesnika koji nemaju hemofiliju (Wilde, 2002.). Infekcija HIV-om se liječi kao i kod bolesnika bez hemofilije antiretrovirusnom terapijom (HAART) (Ragni MV, 2010.). U Hrvatskoj je, srećom, broj bolesnika zaražen HIV-om izrazito nizak.

1.2. GRAĐA I METABOLIZAM KOSTI

1.2.1. Građa kosti

Kostur je organ čija je uloga podupiranje i pokretanje tijela. Građen je od dvije vrste tkiva, kosti i hrskavce, te tri vrste stanica, osteoklasta, osteoblasta i hondrocita. Specifična građa kosti joj omogućuje da istovremeno bude čvrsta kako bi mogla podnositi veliki teret, i elastična kako bi mogla apsorbirati energiju pri udarcu i tako spriječiti lom kosti. Građa kosti se razlikuje među pojedinim kostima, ovisno o tome koju ulogu kost vrši.

Kost je građena od međustanične tvari te koštanih stanica, osteoblasta i osteoklasta. Međustaničnu tvar, osteoid, čine kolagen tipa I, osteokalcin, osteopontin, koštani sijaloprotein i proteoglikani. U osteoid se talože kristali kalcij-hidroksiapatita. Količina kalcij-hidroksiapatita povećava čvrstoću kosti, ali na račun njezine elastičnosti. Mikroarhitektura, raspored i broj međusobnih veza između molekula kolagena također utječu na karakteristike kosti. Kortikalna kost, kakvu nalazimo u dugim cjevastim kostima, ima ulogu nošenja teškog tereta i pokretanja, stoga je naglasak na čvrstoći iznad elastičnosti. S druge strane, trabekularna kost, kakvu nalazimo u trupovima kralježaka, je spužvaste strukture te može apsorbirati veću količinu energije bez rizika prijeloma u usporedbi s dugim kostima. Dakako, na račun elastičnosti se trabekularnoj kosti smanjuje sposobnost podnošenja velikih tereta (Seeman, 2006.).

Osteoblasti su stanice mezenhimnog porijekla. Njihova uloga je proizvodnja i odlaganje međustanične tvari i regulacija djelovanja osteoklasta. Nakon sekrecije matriksa, koji kasnije biva mineraliziran, osteoblasti ukopani u međustaničnu tvar postaju osteociti, najbrojnije stanice u kosti. Osteociti djeluju kao mehanoreceptori. Osteoblasti mogu ostati na površini neaktivne kosti kao pokrovne stanice, ili odumrijeti apoptozom (Ducy, 2000.). Osteoklasti su polinuklearne stanice monocitno-makrofagne loze. Vjeruje se da su jedine stanice koje mogu resorbirati kost. Za diferencijaciju osteoklasta je nužna prisutnost osteoblasta koji luče faktore rasta osteoklasta (Teitelbaum, 2000.).

1.2.2 Koštana pregradnja

Koštana pregradnja je fiziološki proces koji je u kosti trajno prisutan. Uloga pregradnje kosti u vrijeme rasta je postizanje vršne koštane mase, a tijekom odrasle dobi uklanjanje oštećene kosti i održavanje homeostaze kalcija u organizmu. Koštanu pregradnju čine dva paralelna procesa, razgradnja i izgradnja kosti. Za održavanje koštane mase konstantnom ravnoteža između ova dva procesa je vrlo važna, što znači da volumen odstranjene oštećene kosti mora biti zamijenjen jednakom količinom zdrave nove kosti (Seeman, 2006.).

Proces koštane pregradnje započinje aktivacijom osteoklasta koji lučenjem enzima otapaju mineralno koštano tkivo. Osteoblasti tada nastale šupljine ispunjavaju osteoidom koji se kasnije mineralizira. Cijeli proces je reguliran djelovanjem osteoblasta. Za osteoblaste se vjeruje da imaju mehanoreceptorska svojstva te da oni započinju proces pregradnje. U slučaju apoptoze osteoblasta zbog starije dobi, nedostatka estrogena ili viška kortikosteroida, kvaliteta kosti će se smanjiti prije nego se javi manjak koštane mase. Osteoblasti luče ligand receptora za aktivaciju jezgrinog faktora kapa B (RANKL, engl. *receptor activator nuclear factor kappa B ligand*), molekulu koja uz makrofagni stimulator rasta kolonija (M-CSF, engl. *macrophage colony stimulating factor*) potiče diferencijaciju osteoklasta. Osteoklasti na svojoj površini eksprimiraju receptor za RANKL, receptor za aktivaciju jezgrinog faktora kapa B (RANK, engl. *receptor activator nuclear factor kappa B*). Osteoprotegerin (OPG) sintetiziraju osteoblasti, a ima važnu ulogu u modulaciji koštane resorpcije i diferencijaciji osteoklasta. OPG djeluje kao antagonist RANKL-a.

Aktivnost koštane razgradnje se može pratiti mjerenjem koncentracije N-terminalnog (Ntx) i C-terminalnog telopeptida (Ctx) kolagena tipa I i prstenastih piridinolinskih spojeva kolagenih molekula koji nastaju cijepanjem koštanog matriksa djelovanjem enzima koje luče osteoklasti. Aktivnost osteoblasta se može procijeniti mjerenjem koncentracije osteokalcina i koštane alkalne fosfataze koju osteoblasti luče na mjestu formiranja nove kosti.

1.2.3 Utjecaj inaktivnosti na metabolizam kosti

Pregradnja kosti je regulirana složenim mehanizmom, a najvećim je dijelom određena genetskom predispozicijom. Od ostalih faktora je važna fizička aktivnost, osobito ona koja mehanički opterećuje kost. Fizička aktivnost tijekom djetinjstva ima važnu ulogu u postizanju maksimalne, vršne koštane mase, tijekom odrasle dobi u održavanju koštane mase konstantnom, a tijekom starenja u usporavanju gubitka koštane mase. Također, fizička aktivnost u starijoj dobi smanjuje broj padova i fraktura kosti (Nelson, 2004.).

Dokazano je da fizička aktivnost ima pozitivan utjecaj na mineralnu gustoću kosti u muškaraca, te da posebno dizajnirane vježbe mogu povećati i održavati mineralnu gustoću kosti femura, lumbalnog dijela kralježnice i pete. Međutim, budući su razlike između vrijednosti mineralnih gustoća kosti male, iako statistički značajne, njihova klinička značajnost ostaje upitna (Kelley G, 2000.).

Najveći poticaj stvaranju nove kosti je fizički pritisak koji deformira kost, tako da se najveći učinak na mineralnu gustoću kosti može postići vježbama koje opterećuju kosti i zglobove. Vježbe kod kojih samo sila mišića djeluje na kost imaju slabiji utjecaj na mineralnu gustoću kosti. Dodatni faktor je trajanje vježbi. Budući je za jedan ciklus remodeliranja koji obuhvaća resorpciju, formaciju i mineralizaciju kosti potrebno 3-4 mjeseca, minimalno je potrebno 6-8 mjeseci vježbi da bi se formirala nova stabilna koštana masa (Kohrt, 2004.).

1.3 DOSADAŠNJA ISTRAŽIVANJA O KOŠTANOJ PREGRADNJI I MINERALNE GUSTOĆI KOSTI U BOLESNIKA S HEMOFILIJOM

Prevalencija osteoporoze je visoka među bolesnicima s teškim stupnjem hemofilije (Wallny, 2007., Mansouritorghabeh, 2008., Gerstner, 2009., Katsarou O, 2009.). Wallny i suradnici su opisali da gotovo 70% bolesnika s teškom hemofilijom ima smanjenu mineralnu gustoću kosti, s time da 25% bolesnika ima osteoporozu, a 43% osteopeniju (Wallny, 2007.). Gotovo jednake rezultate su na populaciji bolesnika s teškom hemofilijom dobili i Gerstner i suradnici (Gerstner, 2009.). Katsarou je u skupini bolesnika s teškom hemofilijom pronašla čak 55% bolesnika s osteoporozom i 30% bolesnika s osteopenijom, dakle, samo je 13% bolesnika imalo urednu mineralnu gustoću kosti (Katsarou O, 2009.).

Etiologija nastanka smanjene gustoće kosti u bolesnika s hemofilijom nije u potpunosti razjašnjena. Utjecaj fizičke aktivnosti na gustoću kosti je kompleksan, te dijelom još neistražen. U bolesnika s hemofilijom je prisutno nekoliko faktora koji bi mogli imati utjecaja na izgradnju i očuvanje mineralne gustoće kosti. Bolesnici s hemofilijom od ranog djetinjstva, u dobi ključnoj za izgradnju maksimalne gustoće kosti, izbjegavaju fizičke napore, posebice one vježbe koje vrše opterećenje na zglobove. Također su od ranog djetinjstva te kroz odraslu dob prisutne česte imobilizacije zglobova nakon akutnih krvarenja, a smanjenju fizičke aktivnosti pridonosi i izbjegavanje situacija koje bi mogle dovesti do krvarenja, kronični deformiteti zglobova s posljedičnom kroničnom boli, i otežanim pokretanjem.

Ispitivanje mineralne gustoće kosti u djece s teškim oblikom hemofilije, a koja nisu primala profilaktičku terapiju, pokazala su značajno sniženu mineralnu gustoću kosti u usporedbi sa zdravim vršnjacima (Barnes, 2004., Abdelrazik, 2007., Nair, 2007., Tlacuilo-Parra A, 2008.), dok je samo jedno istraživanje pokazalo urednu mineralnu gustoću kosti u bolesnika s hemofilijom dječje dobi (Christoforidis, 2011.). Abdelrazik je pokazao na skupini dječaka do 8 godina značajno reduciranu mineralnu gustoću kosti u usporedbi sa zdravim vršnjacima, te da mineralna gustoća kosti ovisi o stupnju oštećenja zglobova, što je evaluirano kliničkim pregledom (Abdelrazik, 2007.). Međutim, zamijetili su da pojedini

bolesnici imaju smanjenu mineralnu gustoću kosti unatoč relativno očuvanim zglobovima, što bi moglo značiti da na razvoj smanjene mineralne gustoće kosti ne utječe samo patologija zglobova i imobilizacija, već i izbjegavanje sportova i opterećivanja zglobova zbog straha od traume i krvarenja (Abdelrazik, 2007.). Barnes je evaluirao mineralnu gustoću dječaka s hemofilijom dobi od 5 do 18 godina koji su primali profilaktičku terapiju tri puta tjedno, te je opisao umjereno smanjenu mineralnu gustoću kosti (Barnes, 2004.). Tlacuilo-Parra je ispitao ovisnost razine fizičke aktivnosti i mineralne gustoće kosti u dječaka s hemofilijom, te pronašao povezanost između fizičke neaktivnosti i smanjene mineralne gustoće kosti. Čak je 77% dječaka s hemofilijom ocijenjeno kao inaktivno (Tlacuilo-Parra A, 2008.). Ove studije podupiru hipotezu da bolesnici s hemofilijom tijekom djetinjstva ne postižu maksimalnu mineralnu gustoću kosti usporedivu sa zdravom populacijom.

Ovisnost mineralne gustoće kosti u bolesnika s hemofilijom o stupnju oštećenja zglobova je evaluirana i u populaciji odraslih bolesnika (Wallny, 2007., Khawaji, 2009., Gerstner, 2009., Katsarou O, 2009.). Stupanj hemofilične artropatije se može procijeniti kliničkim bodovanjem (Rodriguez-Merchan., 2003.) i Petterssonovim bodovanjem (Pettersson, 1994.). U kliničkoj procjeni se boduje otečenost zgloba, opseg pokreta u zglobu, prisutnost krepitacija pri pokretu, instabilnost zgloba, aksijalni deformitet zgloba, fiksni deformitet zgloba u fleksiji i atrofija mišića. Zbrajanjem boloda se stupanj artropatije ocjenjuje s 0-12 bodova za koljena i gležnjeve, te 0-10 bodova za laktove, što čini 68 maksimalnim brojem bodova koji pojedini bolesnik može imati. U Petterssonovom bodovanju se zglobovi ocjenjuju na temelju rendgenskih promjena na zglobovima. Šest najvećih zglobova se boduje s 0 do 13 bodova, a promjene na zglobovima ocjenjuju specijalisti radiolozi.

Katsarou je korelirala mineralnu gustoću kosti lumbalnog dijela kralježnice i femura s težinom hemofilične artropatije evaluirane kliničkim Petterssonovim bodovanjem, te pokazala da je hemofilična artropatija nezavisni prognostički faktor za razvoj gubitka koštane mase u bolesnika s hemofilijom (Katsarou O, 2009.). Gerstner je povezao niže vrijednosti mineralne gustoće kosti sa smanjenom pokretljivošću zglobova donjih ekstremiteta, te je pokazao da bolesnici s gotovo

urednom pokretljivošću zglobova imaju normalnu mineralnu gustoću kosti (Gerstner, 2009.).

Međutim, nemaju svi bolesnici s teškom hemofilijom smanjenu mineralnu gustoću kosti. Pokazano je da bolesnici s teškom hemofilijom koji su od ranog djetinjstva primali profilaktično liječenje imaju mineralnu gustoću kosti jednaku bolesnicima s blagom hemofilijom (Khawaji, 2009.). Cilj profilatičke terapije je održavanje koncentracije faktora VIII trajno iznad 1% čime se sprečava nastanak spontanijih krvarenja u zglobove, a time i razvoj hemofilične artropatije (Hilberg, 2009.). Dakle, bolesnici koji nisu razvili hemofiličnu artropatiju imaju očuvanu mineralnu gustoću kosti.

Utjecaj fizičke aktivnosti na očuvanje mineralne gustoće kosti u odrasloj dobi je upitan. U bolesnika s hemofilijom je utjecaj fizičke aktivnosti na mineralnu gustoću kosti ispitan na populaciji bolesnika koji su od djetinjstva primali profilaktičko liječenje (Khawaji M. A., 2010.). O tom ispitivanju nije nađena ovisnost mineralne gustoće kosti i fizičke aktivnosti, iako je potrebno naglasiti da su ispitivani bolesnici imali uredne vrijednosti mineralne gustoće kosti.

Rezultati ispitivanja intenziteta koštane resorpcije i koštane izgradnje u bolesnika s hemofilijom su dvojaki. Galacher (Gallacher, 1994.) nije našao razliku u intenzitetu koštane pregradnje u hemofiličara u odnosu na zdravu populaciju, dok novija studija (Katsarou O, 2009.) pokazuje da je u hemofiličara izraženija aktivnost osteoklasta, koji razgrađuju kost, a bez adekvatne istovremene aktivnosti osteoblasta koji bi nadomjestili resorbiranu kost, što bi moglo objasniti smanjenu BMD u bolesnika s hemofilijom.

Procjena aktivnosti koštane pregradnje je bitna za planiranje eventualne terapije osteoporoze odraslih bolesnika s hemofilijom (Kovacs, 2008.).

2. HIPOTEZA I CILJEVI

Metabolizam kosti u bolesnika s hemofilijom je relativno nedavno postao interesom znanstvenih istraživanja. Unaprijeđenjem liječenja hemofilije i produženjem životnog vijeka javila se potreba ne samo za liječenjem krvarenja, već i za unaprijeđenjem kvalitete života bolesnika s hemofilijom, te liječenjem kroničnih posljedica bolesti.

Osteoporoza uzrokuje sklonost prijelomima kosti. U bolesnika s hemofilijom, obzirom na prirodu bolesti, liječenje osteoporotičnih prijeloma je povezano s vrlo visokim periopracijskim rizikom i morbiditetom, te također i vrlo visokom cijenom liječenja.

Rezultati dosadašnjih istraživanja nisu uspjeli točno objasniti etiopatogenezu promjena metabolizma kosti u bolesnika s hemofilijom. Budući je hemofilija rijetka bolest, istraživanja su ograničena malim brojem ispitanika. Također, u dosadašnjim rezultatima ispitivanja metabolizma kosti u bolesnika s hemofilijom postoje kontradiktornosti.

Ovim radom želimo pomoći u razumijevanju nastanka smanjene mineralne gustoće kosti u bolesnika s hemofilijom.

Hipoteza

Bolesnici koji boluju od hemofilije imaju smanjenu mineralnu gustoću kosti, te ubrzanu koštanu razgradnju i smanjenu koštanu izgradnju u usporedbi sa zdravom populacijom iste dobi i spola. Smanjena mineralna gustoća kosti u bolesnika s hemofilijom ovisi o težini hemofilije, broju ciljnih zglobova, prisutnosti protutijela na faktor VIII i infekciji virusom hepatitisa C. Mineralna gustoća kosti se u bolesnika s hemofilijom može objektivno mjeriti kvantitativnim ultrazvukom petne kosti.

Opći cilj istraživanja

Ispitati dinamiku koštane pregradnje i koštani status u bolesnika s hemofilijom i usporediti ih sa zdravom kontrolnom skupinom

Specifični ciljevi istraživanja

1. Usporediti vrijednosti biljega koštane pregradnje i mineralnu gustoću kosti u bolesnika s hemofilijom obzirom na težinu hemofilije, broj ciljnih zglobova, prisutnost protutijela na faktor VIII i infekciju virusom hepatitisa C.
2. Ispitati mineralnu gustoću kosti metodom kvantitativnog ultrazvuka u bolesnika s hemofilijom, i opisati promjene ovisno o težini hemofilije, broju ciljnih zglobova, prisutnosti protutijela na faktor VIII i infekciji virusom hepatitisa C.

Znanstveni doprinos

Ovo je prvo istraživanje u kojem ćemo koštani status odraslih bolesnika s hemofilijom procijeniti metodom kvantitativnog ultrazvuka. Također ćemo po prvi puta testirati ovisnost mineralne gustoće kosti i intenzitet koštane pregradnje o broju ciljnih zglobova.

Nadalje, rezultati ovog istraživanja će doprinijeti boljem razumijevanju utjecaja protutijela na faktor VIII na metabolizam kosti bolesnika s hemofilijom, te pokušati savladati kontradiktornosti dosadašnjih rezultata istraživanja metabolizma kosti u bolesnika s hemofilijom.

3. ISPITANICI I METODE

3.1 Ispitanici

U razdoblju od 2007. do 2011. godine je u istraživanje «Metabolizam kosti u bolesnika s hemofilijom» uključeno ukupno 58 bolesnika koji boluju od hemofilije A ili hemofilije B. Svi bolesnici su u kontroli Centra za hemofiliju KBC Zagreb, referentnog centra za hemofiliju u Hrvatskoj.

Dijagnoza hemofilije je postavljena temeljem aktivnosti faktora VIII ili IX u plazmi prema standardnim kriterijima. Prema koncentraciji faktora VIII i IX je također i hemofilija klasificirana kao teška (FVIII ili FIX <1%), umjerena (FVIII ili FIX 1-5%) ili blaga (FVIII ili FIX >5%) (Mannucci. 2002).

Bolesnici s hemofilijom su podijeljeni u dvije skupine. Prvu grupu je činilo 39 bolesnika s teškom hemofilijom, a drugu grupu 19 bolesnika s umjerenom i blagom hemofilijom. Posebno smo izdvojili i grupu bolesnika s teškom hemofilijom i razvijenim protutijelima na FVIII. Ovih bolesnika je bilo 9.

Kako bismo procijenili mineralnu gustoću kosti i metabolizam kosti bolesnicima je učinjeno mjerenje mineralne gustoće kosti pomoću denzitometrije (N= 58 bolesnika) i kvantitativnog ultrazvuka petne kosti (N=49 bolesnika). U 9 bolesnika nije učinjeno mjerenje mineralne gustoće kosti pomoću kvantitativnog ultrazvuka pene kosti zbog tehničkih razloga (nedostupnost aparata za mjerenje). Biljezi koštane pregradnje su izmjereni u 50 bolesnika. U ispitivanje su uključeni samo oni bolesnici koji nisu imali drugih bolesti koje utječu na metabolizam i mineralnu gustoću kosti. Iz ispitivanja je stoga isključen jedan bolesnik s hemofilijom koji boluje od akromegalije.

Kontrolnu skupinu su činili ispitanici iz već postojećih baza podataka u našoj zemlji.

Kontrolnu skupinu za DXA i biokemijske parametre je činilo 41 zdravih muških pojedinaca koji po dobi odgovaraju ispitanicima. Kontrolnu skupinu za kvantitativni ultrazvuk petne kosti je činilo 49 zdravih muških pojedinaca koji su također prema dobi odgovarali ispitanicima.

3.2 Mjerenje mineralne gustoće kosti

Mineralna gustoća kosti (BMD, engl. bone mineral density) je mjera koja odražava količinu minerala izmjerenog po jedinici površine kosti. Zlatni standard određivanja mineralne gustoće kosti je denzitometrija, dvoenergetska apsorpciometrija rendgenskih zraka (DXA, engl. dual energy X-ray absorptiometry).

Mineralnu gustoću kosti smo kod naših ispitanika mjerili metodom denzitomerije na aparatu QDR Delphi W (S/N 700483) (Hologic, Inc., Waltham, MA, USA). Mjerenja smo učinili na standardnim točkama kako bismo mogli procijeniti gustoću kortikalne i trabekularne kosti. Izmjerali smo mineralnu gustoću lumbalnog dijela kralježnice, vrata bedrene kosti, trohantera i intertrohanteričnog dijela bedrene kosti, te proksimalnog dijela natkoljениčne kosti. Rezultate smo prikazali kao apsolutnu vrijednost u g/cm^2 , te kao T i Z vrijednost. T-vrijednost odražava odstupanje vrijednosti od prosjeka zdrave populacije, odnosno broj standardnih devijacija koje odstupaju ispod ili iznad prosjeka za zdravu populaciju. Z-vrijednost istim principom uspoređuje vrijednosti s kontrolama koje odgovaraju prema dobi i spolu. T i Z vrijednost izračunava programska podrška aparata.

Normalnu mineralnu gustoću kosti, osteopeniju i osteoporozu smo definirali prema preporukama Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, engl. World Health Organisation). Osteoporoza je definirana kao T-vrijednost manja od -2,5, a osteopenija kao T-vrijednost između -1,0 i -2,5. T-vrijednost veća od -1,0 je definirana kao normalna gustoća kosti (WHO. 1994.).

3.3 Mjerenje kvantitativnog ultrazvuka petne kosti

Kvantitativni ultrazvuk petne kosti (QUS, engl. quantitative ultrasound) je metoda koja mjeri karakteristike prolaska zvučnog vala kroz kost, te indirektno daje podatke o mikroarhitekturi kosti i pokazuje dobru korelaciju s rizikom prijeloma bedrene kosti (Khaw KT 2004.).

U ovom istraživanju je kvantitativni ultrazvuk petne kosti učinjen na ultrazvučnom aparatu Sahara® bone sonometer (Hologic, Inc., Waltham, MA, USA).

Ultrazvukom su izmjerene dvije varijable. Slabljenje ultrazvučnog vala pri prolasku kroz kost (BUA, engl. broadband ultrasound attenuation) je izražena u dB/MHz, a brzina ultrazvučnog vala (SOS, engl. speed of sound) u m/s. Iz ovih varijabli programska podrška aparata izračunava kvantitativni ultrazvučni indeks (QUI, engl. quantitative ultrasound index), a izražava se kao postotak. Programska podrška aparata iz podataka BUA i SOS izračunava T-vrijednost. Osteoporoza je definirana kao T-vrijednost manja od -2,5, a osteopenija kao T-vrijednost veća od -2,5, a manja od -1,0.

Kvantitativnim ultrazvukom se standardno vrši mjerenje na jednoj nozi. Budući bolesnici s hemofilijom mogu razviti kronične promjene zgloba gležnja, edem okolnog tkiva bi mogao imati utjecaja na rezultate kvantitativnog ultrazvuka. Stoga smo bolesnicima izmjerili parametre kvantitativnog ultrazvuka na obje noge.

Ultrazvučni aparat je kalibriran prije svakog prvog mjerenja u danu. Koeficijent varijacije je za BUA u skupini ispitanika bio 7%, za SOS 3%.

3.4 Biokemijske metode

Uzorci za laboratorijsku analizu su obrađeni standardnim metodama prema pravilima dobre laboratorijske prakse i uputama proizvođača.

U bolesnika s hemofilijom A je vrijednost faktora VIII, a faktora IX u bolesnika s hemofilijom B, preuzeta iz medicinske dokumentacije. Svim ispitanicima je ponovljeno određivanje prisutnosti protutijela na faktor VIII ili IX. Serologija na hepatitis C je učinjena u ispitanika kod kojih ova pretraga nije bila rađena u prethodnih 6 mjeseci.

Ispitanicima su određene koncentracije koštanog izoenzima alkalne fosfataze, osteokalcin i β -crosslaps.

3.5 Procjena fizičke aktivnosti

Bolesnici su ispunili kratki upitnik o fizičkoj aktivnosti (Dodatak 1). Razina aktivnosti je ocijenjena na temelju samostalne procjene.

3.6 Statističke metode

Podatci su statistički bili obrađeni u programu Statistika 17 i Origin 8. Distribucija varijabli je ispitana Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Rezultati parametrijskih varijabli su prikazani kao aritmetička sredina uz standardnu devijaciju, a rezultati neparametrijske distribucije varijabli kao medijan uz raspon vrijednosti.

Za usporedbu karakteristika dviju nezavisnih grupa parametrijske distribucije varijabli koristili smo t-test za usporedbu nezavisnih grupa, a za parametre neparametrijske distribucije Mann-Whitney U-test.

Povezanost dviju varijabli je analizirana linearnom korelacijom. Spearmanova korelacija je korištena za varijable s neparametrijskom distribucijom, dok je Pearsonova korelacija korištena za parametrijske varijable. U grafičkom obliku rezultati su prikazani putem raspršnih dijagrama, regresijskog pravca i intervala 95% pouzdanosti.

Kao granica značajnosti za sve testove je definiran $p < 0,05$.

Za usporedbu rezultata mjerenja koštanog statusa metodom denzitometrije i metodom kvantitativnog ultrazvuka petne kosti koristili smo Pearsonovu korelaciju. Valjanost kvantitativnog ultrazvuka izračunali tablicom kontingencije 2x2. Osjetljivost metode je definirana kao omjer ispitanika sa sniženom mineralnom gustoćom kosti koje kvantitativni ultrazvuk prepoznaje kao bolesne od ukupno stvarno bolesnih. Specifičnost metode je definirana kao omjer ispitanika s urednom mineralnom gustoćom kosti koje su kvantitativnim ultrazvukom prepoznate kao zdrave s ukupnim brojem stvarno zdravih osoba.

4.REZULTATI

4.1 Osnovne karakteristike bolesnika

U istraživanje je uključeno 58 ispitanika. Njihove osnovne kliničke karakteristike su prikazane u tablici 1.

U ovom ispitivanju smo obradili 58 bolesnika s hemofilijom, od kojih je 57 imalo hemofiliju A, a jedan bolesnik hemofiliju B. Trideset i devet bolesnika (67%) je imalo tešku hemofiliju, a devetnaest (33%) umjereni ili blagi oblik hemofilije. Bolesnik s hemofilijom B je imao teški oblik hemofilije. Dvadeset i tri posto bolesnika s teškim oblikom hemofilije je imao prisutna protutijela na faktor VIII.

Prosječna dob bolesnika se nije značajno razlikovala od dobi zdravih pojedinaca u kontrolnoj skupini, a također niti među grupama bolesnika s teškom, te bolesnika s umjerenom i blagom hemofilijom. Bolesnici s pozitivni protutijelima na FVIII su bili nešto mlađi od bolesnika bez prisutnih protutijela, ali ova razlika nije bila statistički značajna (tablica 2). Bolesnici se također nisu značajno razlikovali u indeksu tjelesne mase u usporedbi s kontrolama, kao niti međusobno unutar pojedinih grupa (tablica 1, 2).

Osamdeset i četiri posto bolesnika je bilo pozitivno na hepatitis C. Postotak HCV pozitivnih bolesnika je bio jednak u skupini bolesnika s teškom i skupini s umjerenom i blagom hemofilijom (84%), a nešto manji (66%) u skupini bolesnika s teškom hemofilijom i prisutnim protutijelima na FVIII (tablica 2).

Bolesnici s hemofilijom su prosječno imali 3,11 ciljnih zglobova (tablica 1). Prema očekivanjima, broj ciljnih zglobova je bio veći u skupini bolesnika s teškom hemofilijom (3,82), nego u skupini bolesnika s umjerenom i blagom hemofilijom (1,70) (tablica 2). Broj ciljnih zglobova na gornjim ekstremitetima je u skupini bolesnika s teškom hemofilijom bio prosječno 0,95, a na donjim ekstremitetima 2,87. U skupini bolesnika s blagom i umjerenom hemofilijom je broj ciljnih zglobova na gornjim ekstremitetima bio prosječno 0,20, a na donjim ekstremitetima 1,50 (tablica

3). Broj ciljnih zglobova se nije značajno razlikovao u bolesnika s teškom hemofilijom ovisno o prisutnosti protutijela na faktor VIII (tablica 3).

Broj ciljnih zglobova, ukupan i onih na donjim ekstremitetima, je pokazao dobru korelaciju s razinom fizičke aktivnosti (tablica 4).

Tablica 1. Osnovne karakteristike ispitanika i kontrolne skupine.

	Hemofilija	Kontrole	p
N	58	41	
Dob (godine)	41,15 ± 13,76	36,82 ± 11,71	NS
BMI (kg/m ²)	25,67 ± 4,57	25,89 ± 2,73	NS
Broj ciljnih zglobova	3,11 (0-6)		
HCV pozitivni	84 (%)		

Kontinuirane varijable su izražene kao aritmetička sredina ± standardna devijacija, kategorijske varijable su prikazane kao n (%), broj ciljnih zglobova je prikazan kao medijan i raspon.

Tablica 2. Osnovne karakteristike ispitanika u grupi teške hemofilije i grupi umjerene i blage hemofilije.

	Teška hemofilija	Umjerena i blaga hemofilija	p
N	39 (67%)	19 (33%)	
Dob (godine)	39,94 ± 12,44	43,63 ± 16,21	NS
BMI (kg/m ²)	25,84 ± 2,73	25,34 ± 3,13	NS
Broj ciljnih zglobova	3,82 (0-6)	1,7 (0-4)	
HCV pozitivni	33 (84%)	16 (84%)	

Kontinuirane varijable su izražene kao aritmetička sredina ± standardna devijacija, kategorijske varijable su prikazane kao n (%), broj ciljnih zglobova je prikazan kao medijan i raspon.

Tablica 3. Broj ciljnih zglobova u pojedinim grupa bolesnika s hemofilijom.

	Bolesnici s teškom hemofilijom	Bolesnici s umjerenom i blagom hemofilijom	p
N	39	19	
Ciljni zglobovi ukupno	3,82 (0-6)	1,70 (0-4)	0,000
gornji ekstremiteti	0,95 (0-2)	0,20 (0-1)	0,000
donji ekstremiteti	2,87 (0-5)	1,50 (0-4)	0,001

Broj ciljnih zglobova je izražen kao medijan i raspon.

Tablica 4. Osnovne karakteristike ispitanika u grupi teške hemofilije bez prisutnih protutijela i grupi teške hemofilije s prisutnim protutijelima na faktor VIII.

	Teška hemofilija s negativnim protutijelima	Teška hemofilija s pozitivnim protutijelima	p
N	31 (77%)	9 (23%)	
Dob (godine)	41,61 ± 12,08	33,22 ± 11,75	NS
BMI (kg/m ²)	26,54 ± 5,39	23,84 ± 3,73	NS
Broj ciljnih zglobova	4,00 ± 1,67	3,89 (2-6)	NS
HCV pozitivni	93%	66%	

Tablica 5. Korelacija broja ciljnih zglobova i razine fizičke aktivnosti.

	Ciljni zglobovi		
Pearsonov koef. r	Ukupno	Gornji ekstremiteti	Donji ekstremiteti
Aktivnost	-0,40	-0,18	-0,39

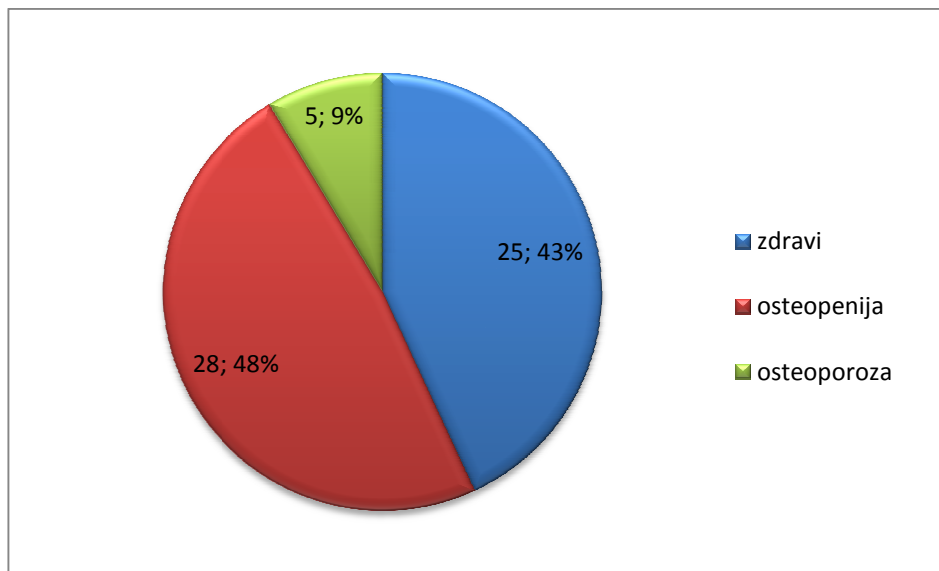
4.2 Rezultati mjerenja mineralne gustoće kosti pomoću denzitometrije

Mineralna gustoća kosti je u bolesnika s hemofilijom evaluirana metodom dvoenergetske apsorpciometrije X-zraka. Mjerenje je učinjeno u svih 58 ispitanika. Mineralna gustoća kortikalne kosti procijenjena je temeljem vrijednosti izmjerenih na distalnom dijelu femoralne kosti, a spongiozne kosti na lumbalnoj kralježnici. Budući su vrijednosti mineralne gustoće kosti pokazivale parametrijsku distribuciju, podaci su obrađeni Studentovim T-testom.

Smanjenu mineralnu gustoću kosti je prema T-vrijednosti imalo 56% bolesnika s hemofilijom. Kao definiciju smanjene mineralne gustoće kosti smo koristili preporuku Svjetske zdravstvene organizacije prema kojoj se osteoporoza definira kao T-vrijednost manja od -2,5, a osteopenija kao T-vrijednost manja od -1,0 do -2,5. Prema ovoj definiciji osteoporozi je imalo 8% bolesnika s hemofilijom mjereno na lumbalnom dijelu kralježnice, te 3% mjereno na vratu bedrene kosti. Osteopeniju je prema T-vrijednosti izmjerenoj na lumbalnoj kralježnici imalo 48%, a na vratu femoralne kosti 53% bolesnika s hemofilijom (slika 1).

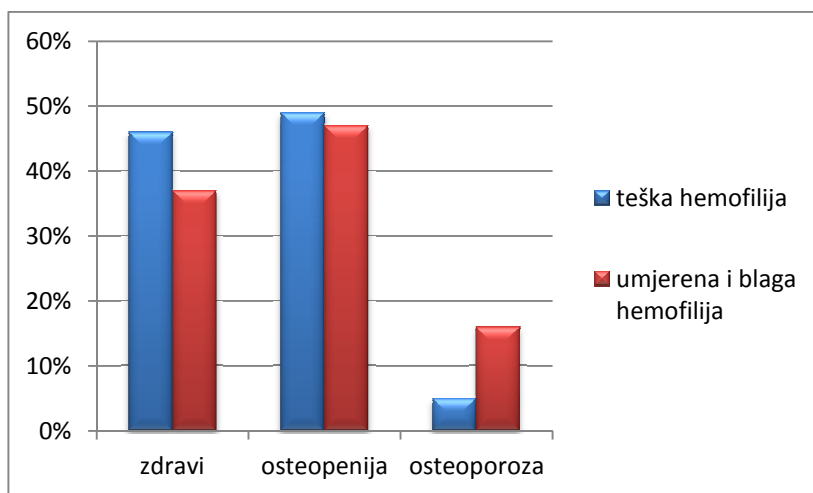
Kada smo usporedili rezultate T-vrijednosti između grupa bolesnika s različitom težinom hemofilije, pronašli smo da je, mjereno na lumbalnom dijelu kralježnice, 5% bolesnika s teškom hemofilijom imalo osteoporozu, a u grupi bolesnika s umjerenom i blagom hemofilijom 16%, dok je osteopeniju imalo 47% odnosno 49% bolesnika (slika 2). Vrijednosti izmjerene na vratu bedrene kosti su pokazale da u skupini bolesnika s umjerenom i blagom hemofilijom 5% bolesnika ima osteoporozu, a 10% osteopeniju, dok u grupi bolesnika s teškom hemofilijom 3% bolesnika ima osteoporozu, a čak 74% osteopeniju (slika 3).

Slika 1. Postotak bolesnika s osteopenijom i osteoporozom u grupi svih bolesnika s hemofilijom.

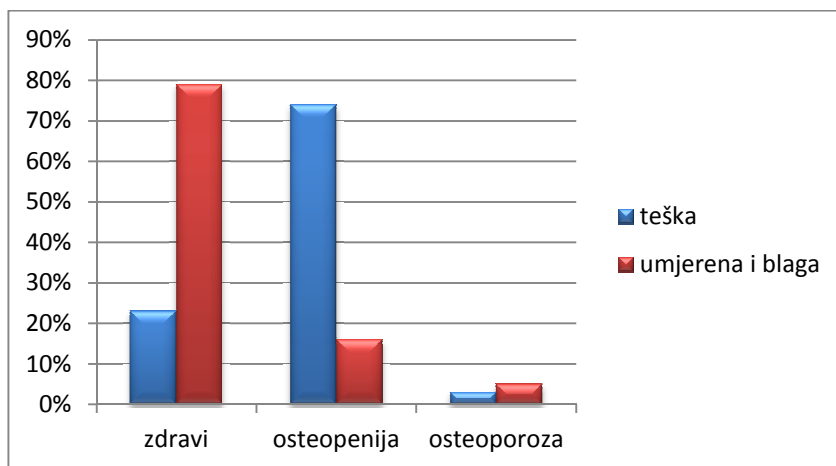


Prikazani su podaci mjereni denzitometrijom na lumbalnom dijelu kralježnice. Osteopenija je definirana kao T vrijednosti od $-1,0$ do $-2,5$, a osteoporoza kao T -vrijednost $< -2,5$. Podaci su izraženi kao apsolutni broj i postotak.

Slika 2. Postotak bolesnika s osteoporozom i osteopenijom ovisno o težini hemofilije, a prema T-vrijednosti izmjerene na lumbalnom dijelu kralježnice.



Slika 3. Postotak bolesnika s osteopenijom i osteoporozom prema težini hemofilije, a prema T-vrijednosti izmjerene na kuku.



U usporedbi sa zdravom kontrolnom skupinom, u bolesnika s hemofilijom su opisane značajno niže vrijednosti mineralne gustoće kosti izražene u apsolutnoj vrijednosti. Značajno niže vrijednosti su izmjerene na vratu bedrene kosti ($0,91 \pm 0,14$ vs. $1,07 \pm 0,17$ g/cm², $p=0,000$) i lumbalnom dijelu kralježnice ($0,97 \pm 0,12$ vs. $1,07 \pm 0,17$ g/cm², $p=0,000$) (tablica 6).

Tablica 6. Usporedba mineralne gustoće kosti u ispitanika i kontrolne skupine.

	Hemofilija N = 58	Kontrole N = 41	p
BMD L1-L4 (g/cm ²)	$0,97 \pm 0,12$	$1,06 \pm 0,12$	0,000
BMD kuk (g/cm ²)	$0,91 \pm 0,14$	$1,07 \pm 0,17$	0,000
BMD neck (g/cm ²)	$0,7720 \pm 0,13360$	$0,89 \pm 0,16$	0,000
BMD trohanter (g/cm ²)	$0,6718 \pm 0,12888$	$0,80 \pm 0,14$	0,000
BMD inter (g/cm ²)	$1,0721 \pm 0,16953$	$1,27 \pm 0,18$	0,000
BMD Ward (g/cm ²)	$0,6363 \pm 0,17585$	$0,77 \pm 0,23$	0,002

Neck – vrat bedrene kosti; Inter – intertrohanterični dio bedrene kosti. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija.

Posebno smo usporedili rezultate mineralne gustoće kosti između pojedinih grupa bolesnika s hemofilijom (tablica 7, tablica 8 i tablica 9). Usporedbom rezultata bolesnika s teškim oblikom hemofilije i onih s umjerenim i blagim oblikom hemofilije nismo našli značajnu razliku vrijednosti mineralne gustoće lumbalnog dijela kralježnice ($0,97 \pm 0,10$ vs $0,98 \pm 0,17$ g/cm², $p=NS$). Međutim su bolesnici s umjerenim i blagim oblikom hemofilije imali značajno više vrijednosti mineralne gustoće kosti izmjerene na vratu bedrene kosti ($0,87 \pm 0,14$ vs $0,99 \pm 0,11$ g/cm², $p=0,000$) (tablica 9).

Tablica 7. Usporedba mineralne gustoće kosti u ispitanika s teškom hemofilijom i kontrolne skupine.

	Teška hemofilija N = 39	Kontrole N = 30	p
BMD L1-L4 (g/cm ²)	0,97 ± 0,10	1,05 ± 0,12	0,002
BMD kuk (g/cm ²)	0,87 ± 0,14	1,06 ± 0,18	0,000
BMD neck (g/cm ²)	0,74 ± 0,14	0,89 ± 0,15	0,000
BMD trohanter (g/cm ²)	0,64 ± 0,12	0,79 ± 0,14	0,000
BMD inter (g/cm ²)	1,02 ± 0,17	1,26 ± 0,18	0,000
BMD Ward (g/cm ²)	0,61 ± 0,18	0,75 ± 0,22	0,005

Neck – vrat bedrene kosti; Inter – intertrohanterični dio bedrene kosti. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija.

Tablica 8. Usporedba mineralne gustoće kosti u ispitanika s umjerenom i blagom hemofilijom i kontrolne skupine.

	Umjerena i blaga hemofilija N = 11	Kontrole N = 19	p
BMD L1-L4 (g/cm ²)	0,98 ± 0,17	1,09 ± 0,10	NS
BMD kuk (g/cm ²)	0,99 ± 0,11	1,10 ± 0,17	NS
BMD neck (g/cm ²)	0,83 ± 0,11	0,90 ± 0,21	0,041
BMD trohanter (g/cm ²)	0,74 ± 0,11	0,83 ± 0,14	NS
BMD inter (g/cm ²)	1,17 ± 0,12	1,30 ± 0,18	NS
BMD Ward (g/cm ²)	0,68 ± 0,17	0,79 ± 0,27	NS

Neck – vrat bedrene kosti; Inter – intertrohanterični dio bedrene kosti. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija.

Tablica 9. Usporedba mineralne gustoće kosti u bolesnika s teškom hemofilijom i bolesnika s umjerenom i blagom hemofilijom.

	Teška hemofilija N = 39	Umjerena i blaga hemofilija N = 19	p
BMD L1-L4 (g/cm ²)	0,97 ± 0,10	0,98 ± 0,17	NS
BMD kuk (g/cm ²)	0,87 ± 0,14	0,99 ± 0,11	0,000
BMD neck (g/cm ²)	0,74 ± 0,14	0,83 ± 0,11	0,014
BMD trohanter (g/cm ²)	0,64 ± 0,12	0,75 ± 0,11	0,001
BMD inter (g/cm ²)	1,02 ± 0,17	1,17 ± 0,12	0,001
BMD Ward (g/cm ²)	0,61 ± 0,18	0,68 ± 0,17	NS

Neck – vrat bedrene kosti; Inter – intertrohanterični dio bedrene kosti. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija.

Kada smo usporedili vrijednosti mineralne gustoće kosti bolesnika s teškom hemofilijom i pozitivnim protutijelima na FVIII ili bez njih, nismo našli statistički značajnu razliku u mjerenjima na lumbalnom dijelu kralježnice niti mjerene na kuku (tablica 10). Također, prema našim rezultatima, bolesnici s hemofilijom i kroničnom infekcijom hepatitisom C nisu imali značajno različite vrijednosti mineralne gustoće kosti u usporedbi s bolesnicima s hemofilijom koji nisu bili HCV pozitivni (tablica 11).

Tablica 10. Usporedba mineralne gustoće kosti bolesnika s teškom hemofilijom i pozitivnim protutijelima na FVIII i bolesnika s teškom hemofilijom i negativni protutijelima na FVIII.

	Teška hemofilija, protutijela na FVIII negativna N = 30	Teška hemofilija, protutijela na FVIII pozitivna N = 9	p
BMD L1-L4 (g/cm ²)	0,96 ± 0,10	0,96 ± 0,10	NS
BMD kuk (g/cm ²)	0,88 ± 0,15	0,83 ± 0,11	NS
BMD neck (g/cm ²)	0,74 ± 0,14	0,74 ± 0,14	NS
BMD trohanter (g/cm ²)	0,63 ± 0,13	0,64 ± 0,10	NS
BMD inter (g/cm ²)	1,04 ± 0,18	0,96 ± 0,12	NS
BMD Ward (g/cm ²)	0,61 ± 0,19	0,65 ± 0,15	NS

Neck – vrat bedrene kosti; Inter – intertrohanterični dio bedrene kosti. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija.

Tablica 11. Usporedba mineralne gustoće kosti u bolesnika s hemofilijom koji su HCV pozitivni i HCV negativni.

	Hemofilija, HCV poz N = 51	Hemofilija, HCV negativna N = 9	p
BMD L1-L4 (g/cm ²)	0,98 ± 0,11	0,95 ± 0,17	NS
BMD kuk (g/cm ²)	0,91 ± 0,14	0,91 ± 0,16	NS
BMD neck (g/cm ²)	0,77 ± 0,12	0,77 ± 0,18	NS
BMD trohanter (g/cm ²)	0,67 ± 0,13	0,68 ± 0,14	NS
BMD inter (g/cm ²)	1,07 ± 0,17	1,06 ± 0,17	NS
BMD Ward (g/cm ²)	0,91 ± 0,16	0,65 ± 0,20	NS

Neck – vrat bedrene kosti; Inter – intertrohanterični dio bedrene kosti. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija.

Također smo provjerili postoji li razlika između vrijednosti mineralne gustoće kosti mjerene na lumbalnom dijelu kralježnice i kuka između HCV pozitivnih i negativnih bolesnika unutar skupina bolesnika s teškom (tablica 12) i bolesnika s umjerenom i blagom hemofilijom (tablica 13). Unutar ovih skupina bolesnika nismo pronašli značajnu razliku vrijednosti mineralne gustoće kosti ovisno o infekciji virusom hepatitisa C. Unutar grupe bolesnika s umjerenom i blagom hemofilijom vrijednosti mineralne gustoće kosti mjerene na kuku su pokazale višu vrijednost u grupi bolesnika koji nisu bili HCV pozitivni, iako nisu dosegle statističku značajnost (tablica 13).

Tablica 12. Usporedba mineralne gustoće kosti u bolesnika s teškom hemofilijom ovisno o infekciji virusom hepatitisa C.

	Bolesnici s teškom hemofilijom, HCV poz N = 32	Bolesnici s teškom hemofilijom, HCV negativna N = 6	p
BMD L1-L4 (g/cm ²)	0,98 ± 0,09	0,89 ± 0,08	NS
BMD kuk (g/cm ²)	0,88 ± 0,14	0,83 ± 0,14	NS
BMD neck (g/cm ²)	0,76 ± 0,13	0,68 ± 0,16	NS
BMD trohaner (g/cm ²)	0,64 ± 0,13	0,62 ± 0,11	NS
BMD inter (g/cm ²)	1,03 ± 0,17	0,97 ± 0,15	NS
BMD Ward (g/cm ²)	0,62 ± 0,18	0,61 ± 0,18	NS

Neck – vrat bedrene kosti; Inter – intertrohanterični dio bedrene kosti. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija.

Tablica 13. Usporedba mineralne gustoće kosti u bolesnika s blagom i umjerenom hemofilijom ovisno o infekciji virusom hepatitisa C.

	Bolesnici s blagom i umjerenom hemofilijom, HCV poz N = 14	Bolesnici s blagom i umjerenom hemofilijom, HCV negativna N = 5	p
BMD L1-L4 (g/cm ²)	0,96 ± 0,14	1,02 ± 0,23	0,09
BMD kuk (g/cm ²)	0,99 ± 0,11	1,01 ± 0,13	NS
BMD neck (g/cm ²)	0,81 ± 0,90	0,88 ± 0,15	NS
BMD trohaner (g/cm ²)	0,74 ± 0,10	0,76 ± 0,14	NS
BMD inter (g/cm ²)	1,17 ± 0,12	1,17 ± 0,13	NS
BMD Ward (g/cm ²)	0,67 ± 0,14	0,71 ± 0,25	NS

Neck – vrat bedrene kosti; Inter – intertrohanterični dio bedrene kosti. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija.

Korelacijom vrijednosti mineralne gustoće kosti mjerene na kuku i lumbalnom dijelu kralježnice i broja i položaja ciljnih zglobova nije ustanovljena značajna međuovisnost varijabli (tablica 14).

Tablica 14. Korelacija mineralne gustoće kosti i broja i položaja ciljni zglobova.

Pearsonov koef. r	svi zglobovi	gornji ekstremiteti	donji ekstremiteti	aktivnost
BMD L1-L4	0,2829	0,27354	0,21633	0,0064
BMD kuk	-0,08829	-0,13973	-0,03966	0,17209

4.3 Rezultati mjerenja kvantitativnog ultrazvuka petne kosti

Analiza kvantitativnog ultrazvuka petne kosti je učinjena u 49 bolesnika. Rezultati mjerenja su uspoređeni s rezultatima kontrolne skupine zdravih pojedinaca koji po dobi i indeksu tjelesne mase odgovaraju ispitanicima. Kontrolna skupina je preuzeta iz ECUM studije (Kastelan, 2006.). Karakteristike bolesnika i kontrolne skupine nisu međusobno značajno razlikovale (tablica 15).

Tablica 15. Osnovne karakteristike ispitanika i kontrole skupine za evaluaciju kvantitativnog ultrazvuka petne kosti.

	Dob (god)	BMI (kg/m ²)
Hemofilija N= 49	40,22 ± 12,24	25,57 ± 4,42
Kontrole N= 49	40,22 ± 12,24	25,95 ± 3,10
p	NS	NS

Distribucija rezultata vrijednosti BUA, SOS i QUI nije značajno odstupala od normale, te je za obradu podataka korišten Studentov T-test.

Mjerenje kvantitativnog ultrazvuka je u ispitanika učinjeno na obje petne kosti, a potom su moguće razlike u rezultatima ultrazvučnih mjera ispitane T-testom za zavisne uzroke. Nisu dobivene značajne razlike između lijeve i desne noge u rezultatima QUS ($t = 1.13$; $p > 0.05$), SOS ($t = 0.41$; $p > 0.05$), te BUA mjerenja ($t = 1.89$; $p > 0.05$) (tablica 16). Stoga su u daljnjim analizama vrijednosti bolesnika s hemofilijom i zdravih ispitanika korišteni podaci samo za jednu nogu. Također smo korelirali vrijednosti parametara QUS-a s gležnjem kao ciljnim zglobovom, te nismo pronašli značajnu korelaciju (tablica 17).

Tablica 16. Usporedba vrijednosti parametara kvantitativnog ultrazvuka petne kosti na obje noge u bolesnika s hemofilijom.

	Aritmetička sredina \pm SD	t	p
QUS lijeva noga	73,72 \pm 16,58	-1,126	NS
QUS desna noga	75,83 \pm 16,73		
BUA lijeva noga	63,55 \pm 19,68	1,893	NS
BUA desna noga	60,37 \pm 14,89		
SOS lijeva noga	1517,99 \pm 27,09	0,412	NS
SOS desna noga	1517,25 \pm 28,07		

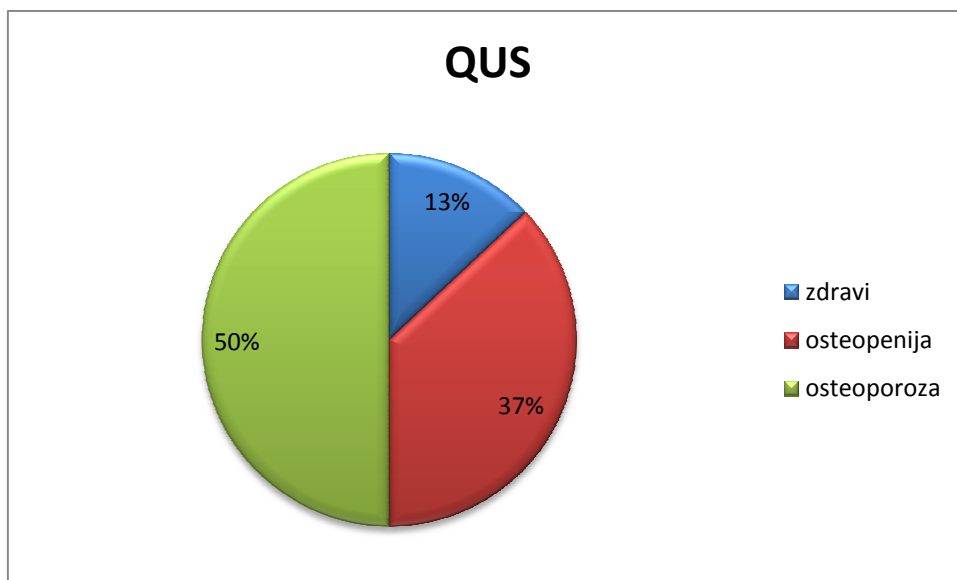
Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija.

Tablica 17. Usporedba vrijednosti parametara QUS-a i zahvaćenosti zgloba gležnja kao ciljnog zgloba.

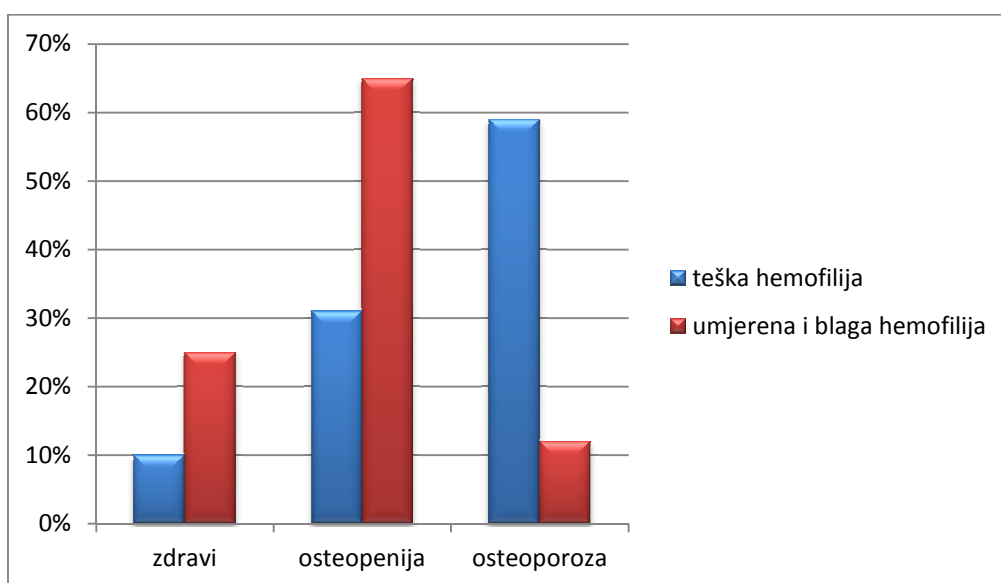
Pearsonov koef. <i>r</i>	QUS QUI	BUA	SOS
gležanj L	-0,08	-0,12	-0,05

Metodom kvantitativnog ultrazvuka normalan nalaz gustoće kosti je pronađen u 14% bolesnika s hemofilijom, dok je osteopenija opisana u 42%, a osteoporoza u 44% bolesnika (slika 4). Među bolesnicima s teškim oblikom hemoofilije normalna gustoća kosti je opisana u 10% bolesnika, osteopenija u 31% a osteoporoza u 59% bolesnika. Bolesnici s umjerenom i blagom hemofilijom su imali normalnu gustoću kosti u 25%, osteopeniju u 65%, a osteoporozu u 12% bolesnika (slika 5). Osteoporoza je definirana kao T-vrijednost manja od -2,5, a osteopenija kao T-vrijednost veća od -2,5, a manja od -1,0.

Slika 4. Postotak osteoporoze i osteopenije u bolesnika s hemofilijom prema T-vrijednostima izmjerenima metodom kvantitativnog ultrazvuka petne kosti.



Slika 5. Postotak osteoporoze i osteopenije u bolesnika s teškom hemofilijom i bolesnika s umjerenom i blagom hemofilijom prema T-vrijednostima izmjerenima metodom kvantitativnog ultrazvuka petne kosti.



Usporedbom rezultata parametara kvantitativnog ultrazvuka petne kosti pokazali smo značajno niže vrijednosti u skupini bolesnika s hemofilijom u usporedbi sa zdravom kontrolnom skupinom (BUA $57,10 \pm 18,45$ vs $82,50 \pm 16,08$ dB/MHz, $p=0,000$, SOS $1722,65 \pm 14,89$ vs $1554,56 \pm 29,29$ m/s, $p=0,000$, (QUI $73,30 \pm 18,62$ vs $100,05 \pm 18,10$, $p=0,000$) (tablica 18). Također, bolesnici s teškim oblikom hemofilije su imali značajno niže vrijednosti svih parametara kvantitativnog ultrazvuka petne kosti u usporedbi s bolesnicima s umjerenim i blagim oblikom bolesti (BUA $53,33 \pm 14,33$ vs $66,63 \pm 22,30$ dB/MHz, $p=0,010$, SOS $1504 \pm 22,20$ vs $1533,27 \pm 31,66$, $p=0,001$, QUI $67,47 \pm 14,19$ vs $84,97 \pm 21,29$, $p=0,001$) (tablica 21). Usporedbom vrijednosti parametara QUS-a u bolesnika s blagom i umjerenom hemofilijom i zdravih kontrola, nismo opisali značajnu razliku vrijednosti (tablica 20), dok je razlika u usporedbi zdravih kontrola i bolesnika s teškom hemofilijom bila značajna za vrijednosti BUA i QUI (tablica19).

Tablica 18. Usporedba vrijednosti kvantitativnog ultrazvuka petne kosti bolesnika s hemofilijom i zdrave kontrolne skupine.

	Bolesnici s hemofilijom N = 48	Kontrolna skupina N = 48	p
BUA (dB/MHz)	$57,10 \pm 18,45$	$82,50 \pm 16,08$	0,000
SOS (m/s)	$1722,65 \pm 14,89$	$1554,56 \pm 29,29$	0,000
QUI	$73,30 \pm 18,62$	$100,05 \pm 18,10$	0,000

Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija.

Tablica 19. Usporedba vrijednosti parametara kvantitativnog ultrazvuka u bolesnika s teškim oblikom hemofilije i kontrole skupine.

	Bolesnici s teškom hemofilijom N = 32	Kontrole N = 32	p
BUA (dB/MHz)	52,33 ± 14,33	83,28 ± 16,13	0,000
SOS (m/s)	1504,84 ± 22,20	1557,09 ± 30,93	0,000
QUI	67,47 ± 14,19	101,56 ± 18,68	0,000

Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ± standardna devijacija.

Tablica 20. Usporedba vrijednosti parametara kvantitativnog ultrazvuka u bolesnika s blagim i umjerenim oblikom hemofilije i kontrolnom skupinom.

	Bolesnici s blagom i umjerenom hemofilijom N = 17	Kontrole N = 17	p
BUA (dB/MHz)	66,63 ± 22,30	80,34 ± 16,39	NS
SOS (m/s)	1533,27 ± 31,66	1547,55 ± 23,85	NS
QUI	84,97 ± 21,29	95,53 ± 16,16	NS

Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ± standardna devijacija.

Tablica 21. Usporedba vrijednosti parametara kvantitativnog ultrazvuka u bolesnika s teškim i bolesnika s blagim i umjerenim oblikom hemofilije.

	Bolesnici s teškom hemofilijom N = 32	Bolesnici s umjerenom i blagom hemofilijom N = 17	p
BUA (dB/MHz)	52,33 ± 14,33	66,63 ± 22,30	0,010
SOS (m/s)	1504,84 ± 22,20	1533,27 ± 31,66	0,001
QUI	67,47 ± 14,19	84,97 ± 21,29	0,001

Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ± standardna devijacija.

Usporedbom rezultata parametara kvantitativnog ultrazvuka petne kosti nismo našli značajnu razliku između vrijednosti bolesnika s teškom hemofilijom i pozitivnim ili negativnim protutijelima na FVIII (tablica 22). Također, razlike nije bilo niti između skupina bolesnika koju su bili HCV pozitivni ili HCV negativni (tablica 23).

Tablica 22. Usporedba vrijednosti parametara kvantitativnog ultrazvuka petne kosti u bolesnika s teškim oblikom hemofilije ovisno o prisustvu protutijela na FVIII.

	Bolesnici s teškom hemofilijom, protutijelima na FVIII pozitivna N=8	Bolesnici s teškom hemofilijom, protutijela na FVIII negativna N=25	p
BUA (dB/MHz)	52,00 ± 16,21	52,44 ± 14,02	NS
SOS (m/s)	1502,96 ± 20,16	1922,13 ± 46,48	NS
QUI	66,57 ± 14,38	67,77 ± 14,42	NS

Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ± standardna devijacija.

Tablica 23. Usporedba vrijednosti parametara kvantitativnog ultrazvuka petne kosti u bolesnika s hemofilijom ovisno o statusu infekcije virusom hepatitisa C.

	Bolesnici s hemofilijom, HCV pozitivni N = 41	Bolesnici s hemofilijom, HCV negativni N = 8	p
BUA (dB/MHz)	56,41 ± 17,13	59,21 ± 24,90	NS
SOS (m/s)	1512,93 ± 24,41	1522,10 ± 45,62	NS
QUI	72,44 ± 16,19	77,43 ± 28,42	NS

Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina ± standardna devijacija.

Vrijednosti parametara QUS-a su pokazale značajnu korelaciju s brojem zahvaćenih ciljnih zglobova na gornjim ekstremitetima, dok korelacija nije nađena između vrijednosti parametara QUS-a te broja ciljnih zglobova na donjim ekstremitetima i ukupnog broja ciljnih zglobova. Također nije nađena korelacija vrijednosti parametara i razine fizičke aktivnosti (Tablica 24).

Tablica 24. Korelacija vrijednosti parametara QUS-a s razinom fizičke aktivnosti, te brojem ciljnih zglobova.

Pearsonov koef. r	QUI	p	BUA	p	SOS	p	T-score	p
aktivnost	-0,085	0,714	-0,066	0,776	-0,080	0,731	-0,089	0,700
svi zglobovi	-0,399	0,073	-0,278	0,221	-0,412	0,063	-0,396	0,075
gornji ekstremiteti	-0,523	0,015	-0,414	0,062	-0,514	0,017	-0,519	0,015
donji ekstremiteti	-0,211	0,358	-0,122	0,598	-0,232	0,311	-0,210	0,360

4.4 Rezultati analize biljega koštane pregradnje

Bolesnicima s hemofilijom smo odredili vrijednosti osteokalcina, koštane alkalne fosfataze i β -crosslapsa. Vrijednosti osteokalcina smo izmjerili u 47 bolesnika s hemofilijom, koštane alkalne fosfataze u 51, a β -crosslapsa u 50 bolesnika. Izmjerene vrijednosti nisu slijedile parametrijsku razdiobu te smo ih evaluirali Mann Whitneyevim testom za neparametrijske varijable.

Usporedbom rezultata bolesnika s hemofilijom i kontrolne skupine smo pokazali da su bolesnici s hemofilijom imali nešto više vrijednosti osteokalcina (13,92 vs 11,40 $\mu\text{g/l}$, $p=0,060$) (tablica 25), iako razlika nije bila statistički značajna. Kada smo usporedili vrijednosti osteokalcina između skupina bolesnika s teškom hemofilijom i bolesnika s umjerenom i blagom hemofilijom, nismo našli statistički značajnu razliku (14,07 vs 13,00 $\mu\text{g/l}$, $p=\text{NS}$) (tablica 28). Vrijednosti koštane alkalne fosfataze su međutim pokazale statistički značajnu razliku u usporedbi bolesnika s hemofilijom i kontrolne skupine (37,30 vs 9,30 IU/l, $p=0,000$) (tablica 25), ali ne i između bolesnika s teškom i bolesnika s umjerenom i blagom hemofilijom (40,00 vs 34,50 IU/l, $p=\text{NS}$) (tablica 28). Vrijednosti β -crosslapsa nisu pokazale statistički značajnu razliku između grupa bolesnika s hemofilijom i kontrola (0,22 vs 0,23 $\mu\text{g/l}$, $p=\text{NS}$) (tablica 25), kao niti između grupa bolesnika s teškom i s blagom i umjerenom hemofilijom (0,22 vs 0,25 $\mu\text{g/l}$, $p=\text{NS}$) (tablica 28). Usporedbom rezultata markera koštane pregradnje bolesnika teškom hemofilijom i zdravim kontrolama opisane su značajno više vrijednosti koštane alkalne fosfataze i granično više vrijednosti osteokalcina (tablica 26), dok su se vrijednosti bolesnika s blagom i umjerenom hemofilijom od zdravih kontrola razlikovale samo u povišenoj vrijednosti koštane alkalne fosfataze (tablica 27).

Tablica 25. Usporedba biljega koštane pregradnje u bolesnika s hemofilijom i u kontrolnoj skupini.

	Hemofilija	Kontrole N = 41	p
Osteokalcin (µg/L) N= 47	13,92 (1,27 – 43,50)	11,40 (3,10 – 29,00)	0,060
Koštana ALP (IU/L) N= 51	37,30 (12,00 – 85,00)	9,30 (4,20-15,60)	0,000
β-crosslaps (µg/L) N= 50	0,22 (0,1 – 2,00)	0,23 (0,08 – 0,56)	NS

Varijable su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon.

Tablica 26. Usporedba biljega koštane pregradnje u bolesnika s teškim oblikom hemofilije i u kontrolnoj skupini.

	Teška hemofilija N = 31	Kontrolna skupina N = 31	p
Osteokalcin (µg/L)	15,50 (2,00 – 43,50)	12,94 (3,10-29,00)	0,060
Koštana ALP (IU/L)	39,97 (12,00-85,00)	9,80 (6,40-15,60)	0,000
β-crosslaps (µg/L)	0,26 (0,01-1,10)	0,25 (0,08 – 0,56)	NS

Varijable su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon.

Tablica 27. Usporedba biljega koštane pregradnje u bolesnika s blagim i umjerenim oblikom hemofilije i u kontrolnoj skupini.

	Umjerena i blaga hemofilija N = 17	Kontrole N = 10	p
Osteokalcin (µg/L)	12,84 (1,27-22,13)	10,21 (3,40-20,02)	NS
Koštana ALP (IU/L)	35,79 (21,00-57,00)	9,14 (4,20-14,00)	0,000
β-cross-laps (µg/L)	0,56 (0,10-2,00)	0,25 (0,11-0,42)	NS

Varijable su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon.

Tablica 28. Usporedba biljega koštane pregradnje u bolesnika s teškim oblikom hemofilije i bolesnika s umjerenim i blagim oblikom hemofilije.

	Teška hemofilija N=31	Umjerena i blaga hemofilija N=17	p
Osteokalcin (µg/L)	14,07 (2,00-43,50)	13,00 (1,27 -22,13)	NS
Koštana ALP (IU/L)	40,00 (12,00-85,00)	34,50 (21,00-57,00)	NS
β-crosslaps (µg/L)	0,22 (0,1 -1,10)	0,25 (1,10-2,00)	NS

Varijable su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon.

Kada smo usporedili vrijednosti osteokalcina, koštane alkalne fosfataze i β-crosslapsa između bolesnika s teškom hemofilijom s pozitivnim protutijelima na FVIII i bolesnika bez protutijela, nismo pronašli značajnu razliku u vrijednostima niti jednog od ovih parametara (tablica 29).

Tablica 29. Usporedba biljega koštane pregradnje u bolesnika s teškom hemofilijom i pozitivnim protutijelima na FVIII i u bolesnika s teškom hemofilijom i negativnim protutijelima na FVIII.

	Teška hemofilija, bez protutijela na FVIII	Teška hemofilija, pozitivna protutijela na FVIII	p
Osteokalcin (µg/L)	14,32 (4,21-43,50) N = 26	19,16 (2,00-25,22) N = 7	NS
Koštana ALP (IU/L)	41,00 (12,00-85,00) N = 25	35,00 (15,00-57,00) N = 7	NS
β-crosslaps (µg/L)	0,24 (0,01-1,10) N = 24	0,21 (0,01-1,18) N = 9	NS

Varijable su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon.

Nismo pronašli značajnu razliku vrijednosti osteokalcina, koštane alkalne fosfataze i β-crosslapsa između bolesnika s hemofilijom ovisno o statusu infekcije virusom hepatitisa C (tablica 30). Razlike nije bilo niti unutar pojedinih grupa bolesnika s hemofilijom ovisno o infekciji virusom hepatitisa C (tablica 31 i tablica

32). Također, nismo našli značajnu razliku niti usporedbom vrijednosti markera koštane pregradnje između bolesnika s urednom i bolesnika sa smanjenom mineralnom gustoćom kosti (tablica 33). Usporedbom vrijednosti parametara koštane pregradnje i mineralne gustoće kosti izmjerene denzitometrijom u bolesnika s hemofilijom nije nađena njihova međuovisnost (tablica 34).

Tablica 30. Usporedba biljega koštane pregradnje u bolesnika s hemofilijom ovisno o infekciji virusom hepatitisa C.

	Hemofilija, HCV pozitivna	Hemofilija, HCV negativna	p
Osteokalcin (µg/L)	14,00 (4,21 -23,98) N = 38	12,60 (1,27-43,50) N = 9	NS
Koštana ALP (IU/L)	39,00 (12,00-85,00) N = 43	36,00 (21,00-56,00) N = 8	NS
β-crosslaps (µg/L)	0,22 (0,01-2,00) N = 41	0,26 (0,08-2,00) N = 9	NS

Varijable su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon.

Tablica 31. Usporedba biljega koštane pregradnje u bolesnika s teškom hemofilijom, ovisno o statusu infekcije virusom hepatitisa C.

	Teška hemofilija, HCV pozitivna	Teška hemofilija, HCV negativna	p
Osteokalcin (µg/L)	14,14 (4,21-23,98) N = 25	13,00 (2,00-43,50) N = 5	NS
Koštana ALP (IU/L)	40,00 (12,00-85,00) N = 29	37,00 (21,00-56,00) N = 4	NS
β-crosslaps (µg/L)	0,22 (0,01,-1,10) N = 28	0,26 (0,15 -56,00) N = 5	NS

Varijable su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon.

Tablica 32. Usporedba biljega koštane pregradnje u bolesnika s blagom i umjerenom hemofilijom ovisno o statusu infekcije virusom hepatitisa C.

	Umjerena i blaga hemofilija, HCV pozitivna	Umjerena i blaga hemofilija, HCV negativna	p
Osteokalcin (µg/L)	13,55 (8,00-22,13) N = 13	6,56 (1,27-20,83) N = 4	NS
Koštana ALP (IU/L)	32,50 (21,00-57,00) N = 14	36,00 (26,00-46,00) N = 4	NS
β-crosslaps (µg/L)	0,25 (0,01,-2,00) N = 13	0,48 (0,08-2,00) N = 4	NS

Varijable su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon.

Tablica 33. Usporedba vrijednosti osteokalcina, koštane alkalne fosfataze i β-crosslapsa u ispitanika s normalnom i bolesnika sa sniženom mineralnom gustoćom kosti.

	Bolesnici s urednom vrijednosti BMD	Bolesnici sa sniženom vrijednosti BMD	p
Osteokalcin (µg/L)	12,84 (1,27-22,13) N = 19	15,50 (2,00-43,50) N = 30	NS
Koštana ALP (IU/L)	37,79 (21,00-57,00) N = 21	39,96 (12,00-85,00) N = 30	NS
β-crosslaps (µg/L)	0,56 (0,01-2,00) N = 21	0,26 (0,01-1,0) N = 29	NS

Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon.

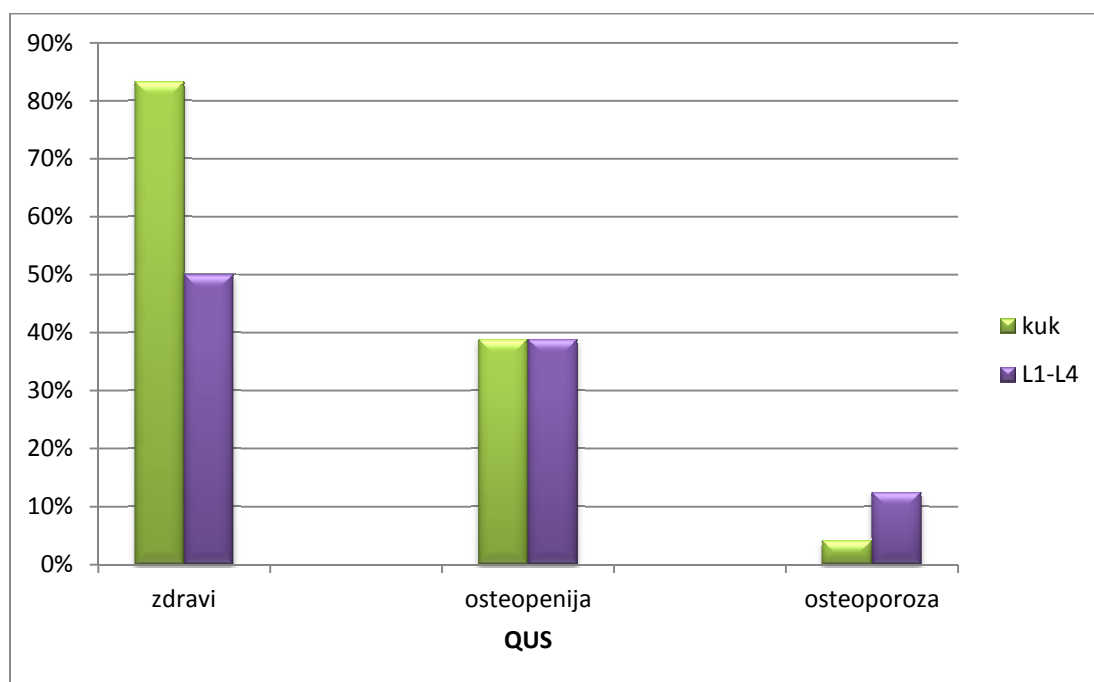
Tablica 34. Korelacija vrijednosti parametara koštane pregradnje i mineralne gustoće kosti izmjerene denzitometrijom u bolesnika s hemofilijom.

Pearson, <i>r</i>	L1-L4	KUK	neck	troch	inter	Ward's
dob	0,1910	0,1120	0,1032	0,1107	0,0829	-0,0375
BMI	0,2110	0,3075	0,1889	0,1919	0,3143	0,0091
osteokalcin	-0,1330	-0,1177	-0,0606	-0,0692	-0,1142	0,0307
koštana ALP	0,0086	-0,0085	-0,1541	0,0385	0,0146	-0,1824
β-crosslaps	0,0572	0,0375	0,0397	0,0061	0,0735	0,2038

4.5 Usporedba rezultata koštanog statusa denzitometrije i kvantitativnog ultrazvuka petne kosti

Usporedili smo T-vrijednosti dobivene mjerenjem mineralne gustoće kosti metodama denzitometrije i kvantitativnog ultrazvuka petne kosti. Osteoprozou i osteopeniju smo definirali prema preporuci Svjetske zdravstvene organizacije, tako da je osteoporoza definirana kao T-vrijednost manja od -2,5, a osteopenija kao T-vrijednost manja od -1,0.

Slika 6. Usporedba T-vrijednosti u bolesnika s hemofilijom izmjerene metodom kvantitativnog ultrazvuka petne kosti (QUS), te denzitometrijom na lumbalnom dijelu kralježnice i kuku.



Osteopenija je definirana kao T vrijednosti od -1,0 do -2,5, a osteoporoza kao T-vrijednost < -2,5. Podaci su izraženi kao postotak.

Metoda kvantitativnog ultrazvuka petne kosti je pokazala visoku osjetljivost (89%) i vrlo nisku specifičnost (13%) u otkrivanju smanjene mineralne gustoće kosti

u bolesnika s hemofilijom. Osjetljivost i specifičnost metode u otkrivanju osteopenije i osteoporoze u bolesnika s hemofilijom je ovom metodom bila vrlo niska.

Usporedbom vrijednosti mineralne gustoće kosti mjerene metodom denzitometrije i metodom kvantitativnog ultrazvuka petne kosti pokazali smo dobru korelaciju ovih vrijednosti ($p < 0,001$). Najviši stupanj korelacije smo dobili između vrijednosti QUI i BMD mjerene na trohanteru (tablica 35, slika 8). Također smo i korelacijom T-vrijednosti dobivene metodama denzitometrije i kvantitativnog ultrazvuka petne kosti dobili značajne korelacije ($p < 0,001$) (Tablica 36).

Tablica 35. Korelacija vrijednosti mineralne gustoće kosti mjerene denzitometrijom i kvantitativnim ultrazvukom petne kosti u bolesnika s hemofilijom.

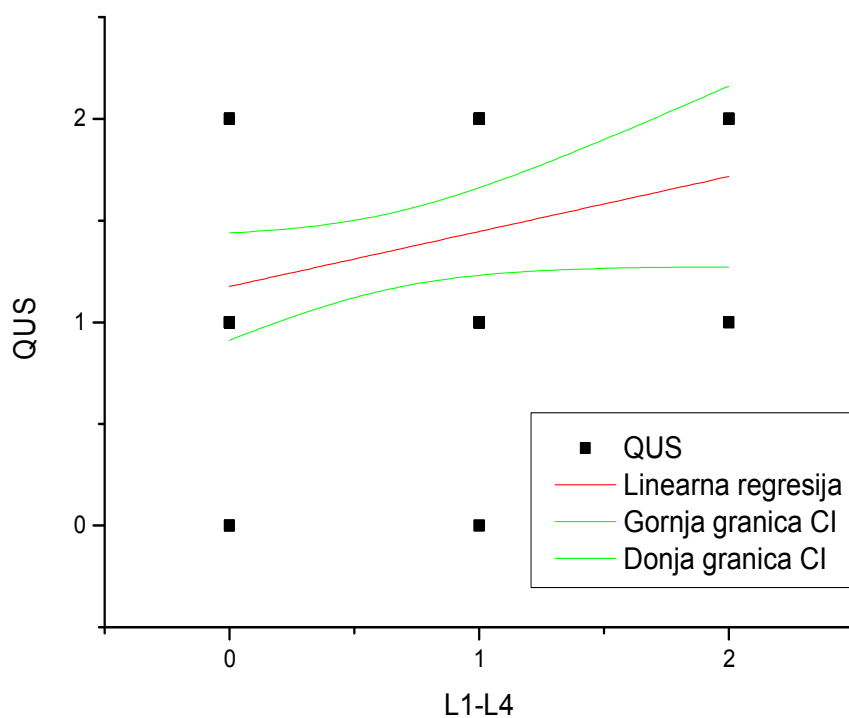
Pearson, r	QUI	BUA	SOS
BMD L1-L4	0,339	0,448	0,200
BMD KUK	0,545	0,582	0,221
BMD neck	0,549	0,535	0,224
BMD troch	0,601	0,448	0,200
BMD inter	0,485	0,537	0,204
BMD Ward's	0,471	0,433	0,263

Vrijednosti mineralne gustoće kosti (BMD) je izražena u g/cm², BUA dB/MHz, a SOS m/s.

Tablica 36. Korelacija T-vrijednosti izmjerene metodom denzitometrije i metodom kvantitativnog ultrazvuka petne kosti u bolesnika s hemofilijom.

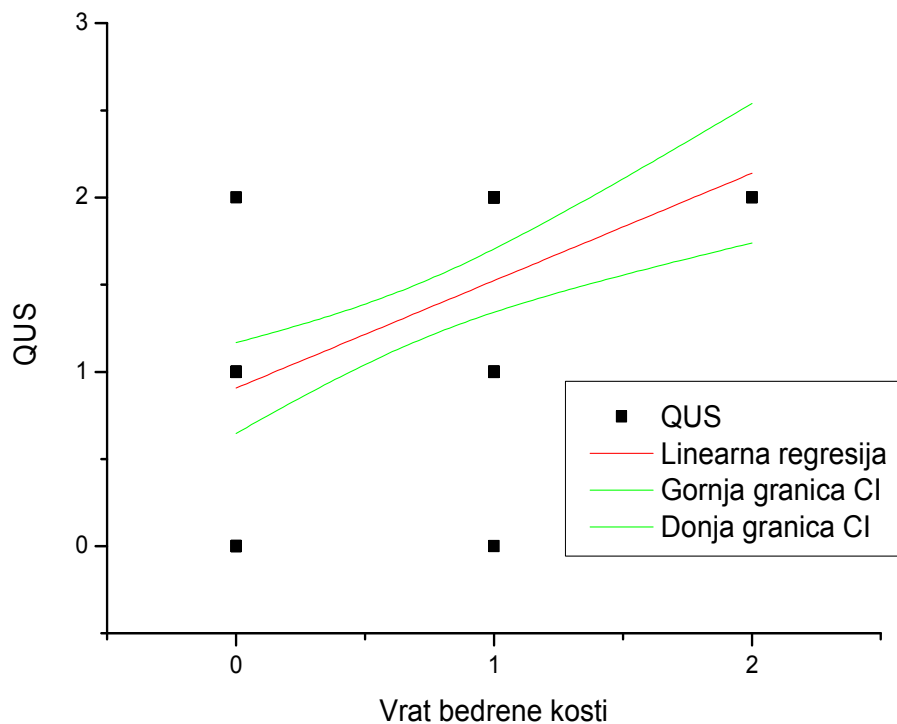
Pearson	L1-l4 T	KUK T	neck T	trach T	inter T	Ward's T
QUI T	0,303	0,551	0,562	0,603	0,504	0,491

Slika 7. Korelacija QUS-a i BMD mjerene na lumbalnom dijelu kralježnice u bolesnika s hemofilijom.



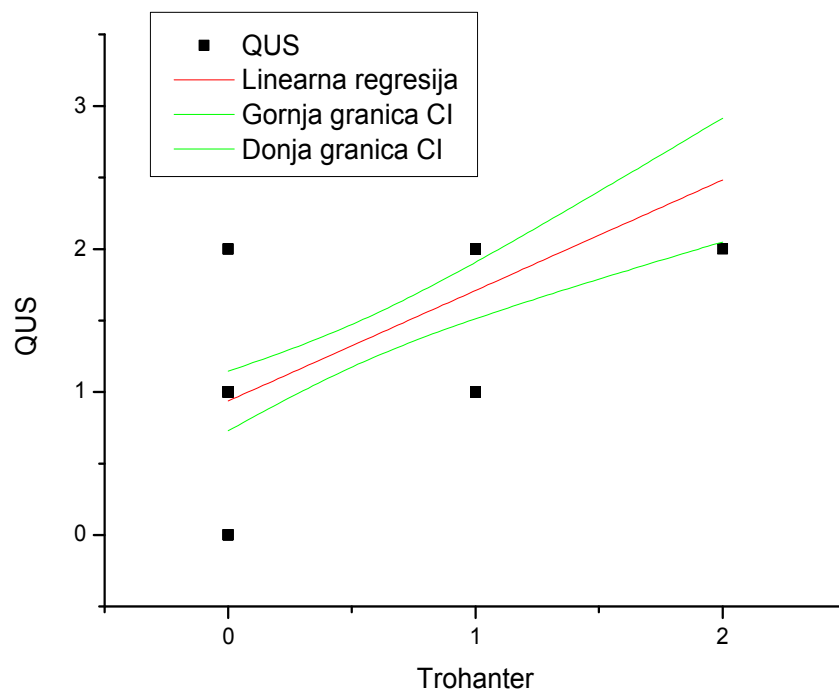
Crvenom linijom označen je regresijski pravac, a zelenom bojom intervali 95% pouzdanosti. Između QUS i BMD mjerene na lumbalnom dijelu kralježnice napravljena je linearna regresija i dobiven stupanj korelacije 0,34, što predstavlja srednje značajnu pozitivnu korelaciju ($p=0,02$).

Slika 8. Korelacija QUS-a i BMD mjerene na vratu bedrene kosti u bolesnika s hemofilijom.



Crvenom linijom označen je regresijski pravac, a zelenom bojom intervali 95% pouzdanosti. Između QUS i BMD mjerene na kuku napravljena je linearna regresija i dobiven stupanj korelacije 0,55, što predstavlja značajnu pozitivnu korelaciju ($p < 0,001$).

Slika 9. Korelacija QUS-a i BMD mjerene na trohanteru bedrene kosti u bolesnika s hemofilijom.

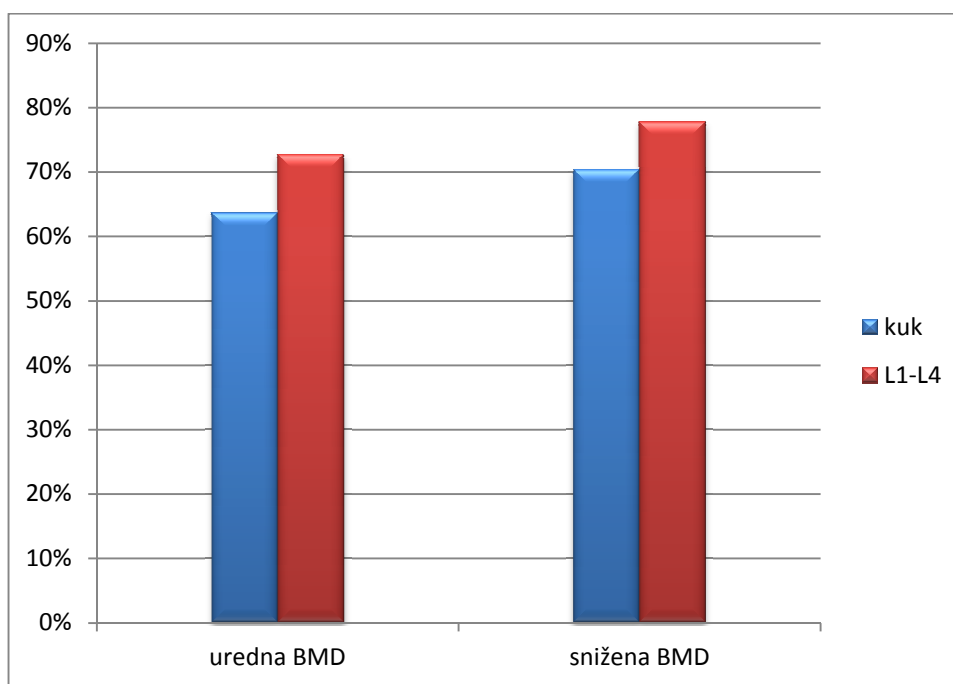


Crvenom linijom označen je regresijski pravac, a zelenom bojom intervali 95% pouzdanosti. Između QUI i BMD mjerene na kuku napravljena je linearna regresija i dobiven stupanj korelacije 0,60, što predstavlja značajnu pozitivnu korelaciju ($p < 0,001$).

Obzirom na visoku osjetljivost i nisku specifičnost metode kvantitativnog ultrazvuka petne kosti u otkrivanju smanjene mineralne gustoće kosti u bolesnika s hemofilijom, te podatka o dobroj korelaciji rezultata ovih dviju metoda, izabrali smo negativniju prijelomnu T-vrijednost kvantitativnog ultrazvuka za definiranje osteopenije i osteoporoze. Tako smo osteoporozu definirali kao T-vrijednost manju od -3,0, a osteopeniju kao T-vrijednost od -2,0 do -3,0. Prema ovim vrijednostima je među bolesnicima s hemofilijom 45% imalo urednu mineralnu gustoću kosti, 37% osteopeniju, a 18% osteoporozu.

Uz modificiranu definiciju T-vrijednosti QUS-a, metoda se pokazala kao 70,4% osjetljiva i 64% specifična u otkrivanju smanjene mineralne gustoće kosti u bolesnika s hemofilijom.

Slika 10. Usporedba T-vrijednosti u bolesnika s hemofilijom izmjerene metodom kvantitativnog ultrazvuka petne kosti (QUS), te denzitometrijom na lumbalnom dijelu kralježnice i kuku.



Uredna i snižena BMD su definirane temeljem T-vrijednosti QUS-a, gdje je T-vrijednost manja od -2,0 je smatrana kao snižena BMD.

RASPRAVA

Životni vijek bolesnika s hemofilijom je zadnjih desetljeća značajno produžen, najviše zahvaljujući dostupnosti lijeka i boljoj skrbi za bolesnike. Prema podacima za Veliku Britaniju, životni vijek bolesnika s umjerenom i blagom hemofilijom se ne razlikuje od životnog vijeka opće populacije (Konkle, 2011.). Također, prema podacima za period od 1977.-2001. godine životni vijek bolesnika s teškom hemofilijom koji nisu inficirani HIV-om je bio 63 godine u Velikoj Britaniji, 70 godina u Nizozemskoj, te čak 73 godine u Kanadi (Dolan, 2010). S porastom dobi javljaju se i novi problemi bolesnika s hemofilijom, kao što su kardiovaskularne i bubrežne bolesti, tumori te promjene mišićno-koštanog sustava (Philipp, 2010., Dolan, 2010). Mišićno-koštane bolesti zahvaćaju velik broj bolesnika s teškom hemofilijom, odnosno sve one koji nisu od djetinjstva primali profilaktičku terapiju koncentratima faktora. Hemofilična artropatija je povezana s deformacijom zglobova, slabosti mišića i oštećenom propriocepcijom (Nilsson, 1992., Siboni, 2009.). Takve promjene uzrokuju imobilnost, kroničnu bol, povećan rizik padova i socijalnu izolaciju (Street, 2006., Hilberg T. C., 2009.). Također, prije sedam godina je prvi puta primijećeno da bolesnici s hemofilijom imaju smanjenu mineralnu gustoću kosti (Gallacher, 1994.), te su od tada metaboličke promjene kosti postale predmetom znantvenog i kliničkog interesa.

Smanjena mineralna gustoća kosti u bolesnika s hemofilijom se objašnjava niskom vršnom mineralnom gustoćom kosti postignutom u djetinjstvu i adolescenciji, te ubrzanim gubitkom koštane mase u odrasloj dobi uslijed smanjene pokretljivosti bolesnika, a koje je posljedica razvoja hemofilične artropatije. Međutim, točna etiologija smanjene kvalitete kosti nije poznata, kao niti rizični faktori koji pridonose razvoju osteoporoze u bolesnika s hemofilijom. Budući patofiziologija gubitka koštane mase u bolesnika s hemofilijom nije razjašnjena, ostaje otvoreno pitanje potrebe i načina liječenja bolesnika s osteopenijom i osteoporozom (Kovacs, 2008.).

Smanjenje mineralne gustoće kosti je povezano s povećanim rizikom nastanka osteoporotičnih prijeloma kosti (Gosh, 2007.). Obzirom na osnovne značajke hemofilije, ova skupina bolesnika zahtjeva posebnu brigu oko zbrinjavanja prijeloma (Rodriguez-Merchan, 2002.). Također, u bolesnika s hemofilijom je

snižena mineralna gustoća kosti povezana s lošijom kvalitetom života (Khawaji, 2001.).

Istraživanja mineralne gustoće kosti su do sada obuhvatila relativno mali broj ispitanika, što je velikim dijelom uvjetovano činjenicom da je hemofilija rijetka bolest. Rezultati istraživanja se međusobno razlikuju u prevalenciji osteopenije i osteoporoze, te u procjeni faktora rizičnih za nastanak smanjene mineralne gustoće kosti.

Ovim smo istraživanjem obuhvatili 58 bolesnika s hemofilijom koji se kontroliraju u Referentnom centru za hemofiliju Republike Hrvatske. Pokazali smo da bolesnici s hemofilijom imaju smanjenu mineralnu gustoću kosti koja ovisi o stupnju hemofilije, a neovisna je o prisustvu protutijela na faktor VIII, infekciji virusom hepatitsa C ili broju i položaju ciljnih zglobova.

Smanjenu mineralnu gustoću kosti mjerenu metodom denzitometrije smo pronašli u 56% naših bolesnika s hemofilijom. Većina ovih bolesnika je imala osteopeniju, dok smo kod tek malog postotka bolesnika pronašli osteoporozu. Uspoređujući mineralnu gustoću kortikalne i spongiozne kosti, pokazali smo da bolesnici s hemofilijom imaju teže promjene spongiozne kosti. Ovaj nalaz je u suprotnosti s do sada objavljenim rezultatima za populaciju bolesnika s hemofilijom (Katsarou O, 2009.). Međutim, u skupini postmenopauzalnih žena je također opisano da osteoporoza teže zahvaća lumbalnu kralježnicu nego femoralnu kost. Ova razlika između mineralne gustoće kortikalne i spongiozne kosti je dodatno naglašena u skupini bolesnika s umjerenom i blagom hemofilijom, gdje bolesnici u usporedbi s bolesnicima s teškom hemofilijom imaju značajno više vrijednosti mineralne gustoće kortikalne, ali ne i spongiozne kosti.

Nižu prevalenciju smanjene mineralne gustoće kosti u naših bolesnika u usporedbi s drugim objavljenim rezultatima nije lako objasniti. U do sada objavljenim istraživanjima se postotak smanjene mineralne gustoće kosti u bolesnika s teškom i umjerenom hemofilijom (FVIII<3%) kretao od 86% (Katsarou O, 2009.) do 70% (Gerstner, 2009., Wallny, 2007.). Naši rezultati su pokazali smanjenu mineralnu gustoću kosti u 57% bolesnika s hemofilijom, te 53% bolesnika s teškom hemofilijom. U skupini bolesnika s teškom hemofilijom je razlika u prevalenciji osteoporoze još izraženija. Dok je osteoporoza opisana u 5% naših bolesnika s

teškom hemofilijom, postoci su mnogo viši u ostalim studijama; 55% (Katsarou O, 2009.), 43% (Gerstner, 2009.), 43% (Wallny, 2007.) i 50% (Nair, 2007.). Jedina studija koja je pokazala manju prevalenciju osteoporoze u bolesnika s teškom hemofilijom je švedska studija koja je pokazala da bolesnici s teškom hemofilijom imaju mineralnu gustoću kosti jednaku bolesnicima s blagom hemofilijom (Khawaji M. A., 2009.). Svi bolesnici uključeni u navedenu studiju su od djetinjstva bili na profilaktičkom liječenju koncentratima faktora, što implicira da primarna profilaksa može očuvati mineralnu gustoću kosti. U ostalim objavljenim studijama nije naglašen oblik terapije koju su bolesnici primali. Bolesnici s teškim oblikom hemofilije uključeni u naše istraživanje su primali terapiju prema potrebi, u slučaju pojave znakova krvareja ili prije događaja rizičnih za nastanak krvarenja. Također, gotovo svi bolesnici su bili u programu kućne terapije. Kućna terapija omogućava vrlo brzu primjenu lijeka, već kod prvih znakova krvarenja, što smanjuje oštećenje hrskavice i razvoj hemofilične artropatije. Također, kućna terapija povećava kvalitetu života, uključujući kraće imobilizacije i mirovanja, omogućava sudjelovanje u fizičkim aktivnostima, te smanjuje broj izostanaka iz škole ili s posla (Teitel JM, 2004.). Međusobna veza primjene kućne terapije i osteoporoze nije do sada ispitivana, međutim možemo pretpostaviti da bi poboljšana kvaliteta života, veća sloboda u fizičkim aktivnostima i manji broj imobilizacija i mirovanja nakon krvarenja mogla povoljno utjecati na izgradnju odnosno očuvanje mineralne gustoće kosti. Međutim, obzirom na složenu etiologiju nastanka smanjene mineralne gustoće kosti u bolesnika s hemofilijom, te nedostatak svi podataka, ne možemo sa sigurnošću zaključiti koji je razlog niske prevalencije osteoporoze u naših bolesnika s hemofilijom.

Ovim smo istraživanjem također pokazali da mineralna gustoća kosti ovisi o stupnju hemofilije. Dosadašnja istraživanja metabolizma kosti bolesnika s hemofilijom su uglavnom obuhvaćala bolesnike s teškom hemofilijom. Podataka o mineralnoj gustoći bolesnika s umjerenom hemofilijom je malo (Katsarou O, 2009., Gerstner, 2009., Khawaji M. A., 2009.), dok podataka o metabolizmu kosti bolesnika s blagom hemofilijom nema. U našem smo istraživanju pokazali da bolesnici s umjerenom i blagom hemofilijom imaju smanjenu mineralnu gustoću kosti u usporedbi sa zdravim kontrolama, ali da u usporedbi s bolesnicima s teškom

hemofilijom razlika postoji samo u gustoći kortikalne kosti. Ovi rezultati su bili očekivani obzirom na blažu klinički sliku bolesnika s umjerenom i blagom hemofilijom, manjem broju krvarenja, manjem broju ciljnih zglobova, te blažem stupnju hemofilične artropatije.

Neočekivano, postotak bolesnika s osteoporozom je bio veći u grupi bolesnika s umjerenom i blagom hemofilijom, nego u grupi bolesnika s teškom hemofilijom. Međutim, obzirom na relativno mali broj ispitanika, te svega 2 odnosno 3 bolesnika s osteoporozom u grupi teške i u grupi umjerene i blage hemofilije, prije donošenja zaključaka će biti potrebna daljnja istraživanja na većem broju ispitanika.

Istraživanja na bolesnicima s hemofilijom su pokazala značajnu korelaciju gustoće mineralne kosti sa stupnjem artropatije (Nair, 2007., Katsarou O, 2009.). Uz genetsku predispoziciju fizička aktivnost jedna od važnijih čimbenika za koje se zna da utječu na metabolizam kosti, te postizanje maksimalne mineralne gustoće kosti tijekom djetinjstva i adolescencije (Kriemler, 2008., Zouch, 2008.). Razina fizičke aktivnosti bolesnika s hemofilijom uvelike ovisi o stupnju hemofilične artropatije. Stupanj artropatije je u dosadašnjim istraživanjima evaluiran fizikalnim pregledom (Rodriguez-Merchan., 2003., Nair, 2007.) ili kliničkim bodovanjem prema Svjetskoj federaciji hemofilije (Orthopedic Advisory council of the World Federation of Hemophilia) (Rodriguez-Merchan., 2003.) i Pettersonovim radiografskim bodovanjem (Pettersson, 1994., Katsarou O, 2009.).

Za procjenu stupnja artropatije smo u ovom istraživanju koristili broj i položaj ciljnih zglobova. Broj ciljnih zglobova je relativno jednostavna metoda procjene stupnja hemofilične artropatije koja se bazira na kliničkom pregledu i anamnestičkim podacima. Pokazali smo da broj ciljnih zglobova pokazuje dobru korelaciju sa stupnjem hemofilije, te nešto manje značaju korelaciju s fizičkom aktivnošću bolesnika.

Korelirali smo mineralnu gustoću kosti s brojem ciljnih zglobova, što dosada nije opisano u objavljenoj literaturi. Prema našim rezultatima broj ciljnih zglobova nije pokazao dobru korelaciju s vrijednostima mineralne gustoće kosti mjerene na kuku i lumbalnom dijelu kralježnice. S druge strane, broj ciljnih zglobova je pokazao dobru korelaciju s vrijednostima parametara kvantitativnog ultrazvuka petne kosti. Nedostatak metode procjene hemofilične artropatije temeljem broja ciljnih zglobova

je što ne govori o tome koliko često se javljaju krvarenja u navedeni zglob, niti koliko je oštećenje zgloba teško, a što su parametri koji bi mogli imati utjecaja na razvoj smanjene mineralne gustoće kosti u bolesnika s hemoofilijom.

Utjecaj prisutnosti protutijela na faktor VIII na mineralnu gustoću kosti je do sada ispitan na vrlo malom broju bolesnika. Pokazano je da bolesnici sa smanjenom mineralnom gustoćom kosti imaju statistički veću vjerojatnost imati pozitivna protutijela na FVIII (Gerstner, 2009.). Međutim, u našem istraživanju na 9 bolesnika s pozitivnim protutijelima nismo pronašli statistički značajnu razliku mineralne gustoće kosti u usporedbi s bolesnicima bez prisutnih protutijela, niti metodom denzitometrije niti kvantitativnim ultrazvukom petne kosti.

Razvoj protutijela na FVIII i FIX je trenutno jedan od najvećih izazova u liječenju bolesnika s hemoofilijom. Bolesnici s razvijenim protutijelima imaju povećani morbiditet i mortalitet, te duža i ozbiljnija krvarenja u odnosu na bolesnike bez prisutnih protutijela (Franchini, 2009.). Stoga se u ovih bolesnika poseban naglasak stavlja na potrebu što ranijeg liječenja nastalih krvarenja, primjenu profilaktičke terapije te provedbu edukacije i kućnog liječenja (ZS. Salek, 2011., Oyesiku, 2011.) Rano zaustavljanje krvarenja je ključno u sprečavanju oštećenja zglobne hrskavice, a time i očuvanju od razvoja hemofilične artropatije (Astermark, 2007.). Dodatni problem u bolesnika s razvijenim inhibitorima je izbor lijeka, te je proveden niz studija s ciljem evaluacije pojedinog lijeka u liječenju akutnog krvarenja i primjeni profilaktičkog liječenja (Franchini, 2009., Treur, 2009.).

Bolesnici s pozitivnim protutijelima liječeni u našem Centru, a time i bolesnici uključeni u ovo istraživanje, primaju profilaktičko liječenje rFVIIa ili aPCC, dok je terapija izbora u akutnom krvarenju rFVIIa. U istraživanju koje je pokazalo da prisutnost protutijela ima negativan utjecaj na mineralnu gustoću kosti (Gerstner, 2009.) nije naznačena terapija u ovih bolesnika, stoga nije moguće procijeniti ima li terapijski režim utjecaja na mineralnu gustoću kosti bolesnika s prisutnim protutijelima. Također, nismo našli niti značajnu razliku u broju ciljnih zglobova između bolesnika sa ili bez prisutnih protutijela na FVIII, a što bi mogao biti dodatni dobar pokazatelj uspješnog liječenja bolesnika s protutijelima.

Infekcija virusom hepatitisa C je povezana s pojavom osteoporoze. Hipogonadizam, promjene u metabolizmu vitamina D i povišene vrijednosti

bilirubina kao posljedica kronične jetrene lezije potiču razgradnju kosti, te imaju negativan utjecaj na izgradnju nove kosti (Olsson, 1994., Schiefke, 2005., Tsuneoka, 1996.). Rezultati studija koje su proučavale utjecaj infekcije virusom hepatitisa C na mineralnu gustoću kosti nisu jednoznačne. U dvije studije (Nair, 2007., Barnes, 2004.) nije opisana razlika mineralne gustoće kosti između HCV pozitivnih i HCV negativnih bolesnika. S druge strane, Wallny je pokazao da HCV pozitivni bolesnici imaju značajno nižu mineralnu gustoću kosti od HCV negativnih bolesnika (Wallny, 2007.). Prema rezultatima našeg istraživanja, mineralna gustoća kosti bolesnika s hemofilijom ne ovisi o infekciji hepatitisa C. Međutim, kada smo analizirali utjecaj infekcije virusom hepatitisa C unutar grupa bolesnika ovisno o težini bolesti, pokazali smo da u grupi bolesnika s umjerenom i blagom hemofilijom postoji tendencija nižoj mineralnoj gustoći lumbalnog dijela kralježnice u HCV pozitivnih bolesnika.

Procjena mineralne koštane mase metodom kvantitativnog ultrazvuka petne kosti do sada nije učinjena u odraslih bolesnika s hemofilijom. Objavljeno je tek jedno istraživanje koje je pokazalo urednu mineralnu gustoću kosti dječaka s teškom i umjerenom hemofilijom, mjerenom kvantitativnim ultrazvukom i denzitometrijom (Christoforidis, 2010.). U istom istraživanju nije nađena korelacija između rezultata dvije metode, kvantitativnog ultrazvuka petne kosti i denzitometrije.

Prema našim rezultatima bolesnici s hemofilijom su u usporedbi sa zdravim kontrolama imali značajno niže vrijednosti parametara QUS-a. Vrijednost ovih parametara je ovisila o stupnju hemofilije, dok prisutnost protutijela na FVIII i infekcije virusom hepatitisa C nije imala utjecaja. Ovi rezultati se poklapaju s našim rezultatima dobivenim mjerenjem mineralne gustoće kosti pomoću denzitometrije. Također su rezultati parametara kvantitativnog ultrazvuka pokazali značajan stupanj korelacije s rezultatima denzitometrije. Podaci u literaturi o korelacijama vrijednosti denzitometrije i kvantitativnog ultrazvuka su različiti. Dok je ispitivanjima kosti in vivo i in vitro pokazana slaba korelacija rezultata ove dvije metode (Toyraş, 1999.), drugi su autori kliničkim ispitivanjima pronašli visoke korelacije (Iida, 2010). Međutim, unatoč različitim korelacijama s nalazima denzitometrije, QUS se pokazao kao dobar prediktor rizika prijeloma u žena (Bauer, 1995., Hans, 1996.) i muškaraca (Khaw, 2004.). Postavlja se pitanje koja je metoda bolja u procjeni rizika fraktura

pojedinih skupina bolesnika, odnosno o kojim parametrima osim mineralne gustoće kosti ovise rezultati mjerenja BUA i SOS. Primjerice, u bolesnika sa sekundarnom osteoporozom uzrokovanoj uzimanjem kortikosteroida metoda denzitometrije se nije pokazala dobrom u procjeni rizika frakture kosti, za razliku od postmenopauzalne osteoporoze gdje rezultati denzitometrije dobro koreliraju s rizikom nastanka frakture (Staa, 2003.). U skupini bolesnika ispitivanih u ovoj studiji nije zabilježen niti jedan prijelom koji nije bio jasno povezan s jačom traumom, te će biti potrebno daljnje prospektivno praćenje bolesnika koje bi moglo dati odgovor o boljem izboru metode za procjenu rizika frakture kosti u bolesnika s hemofilijom.

Unatoč dobroj korelaciji vrijednosti mineralne gustoće kosti mjerenih metodama denzitometrije i QUS-a, QUS je pokazao vrlo nisku specifičnost uz visoku osjetljivost u otkrivanju smanjene mineralne gustoće kosti, pokušali smo poboljšati specifičnost promjenom prijelomne T-vrijednost u definiciji osteopenije i osteoporoze. Iako većina autora osteoporozi definira kao T-vrijednost QUS-a manju od -2,5, postoje radovi u kojima je prijelomna T-vrijednost za definiciju osteoporoze pomaknuta na $<-1,8$ (Frost, 2000). Međutim, promatranjem naših rezultata smo shvatili da bi prijelomna T-vrijednost za definiciju osteoporoze, odnosno smanjene mineralne gustoće kosti trebala biti pomaknuta prema negativnijim vrijednostima. Naime, mogući utjecaj na vrijednosti parametara QUS-a u bolesnika s hemofilijom može imati lokalni edem mekih česti oko petne kosti kao posljedica kronične artropatije zgloba gležnja ili posljedica akutnog krvarenja (Johansen, 1997.). Utjecaj edema mekih česti na vrijednosti parametara QUS-a smo pokušali verificirati usporedbom parametara QUS-a mjerenima na obje pete i pronašli da se one međusobno ne razlikuju, neovisno o prisutnosti gležnjeva kao ciljnih zglobova. Ipak, kada smo uredan nalaz T-vrijednosti definirali kao veći od -2,0, specifičnost metode QUS-a u otkrivanju smanjene mineralne gustoće kosti je značajno narasla, uz smanjenje osjetljivosti metode.

Do sada objavljeni rezultati vrijednosti biljega koštane pregradnje u bolesnika s hemofilijom su malobrojni. U bolesnika s hemofilijom dobi od 6 do 16 godina su opisane niske vrijednosti osteokalcina u bolesnika s niskom mineralnom gustoćom kosti, što sugerira smanjenu aktivnost osteoblasta u formiranju nove kosti (Tlacuilo-Parra, 2010.), dok je drugo istraživanje pokazalo pojačanu aktivnost osteoklasta s

kompenzatornom aktivacijom osteoblasta u bolesnika s teškom hemofilijom starosti 4-17 godina (Christoforidis A. E., 2010.). Bitno je naglasiti da bolesnici iz navedenog istraživanja nisu imali sniženu mineralnu gustoću kosti. S druge strane, u odraslih bolesnika s hemofilijom su opisane povišene vrijednosti markera koštane razgradnje koje nije pratio adekvatan porast vrijednosti markera koštane izgradnje (Katsarou O, 2009.). Rezultati određivanja markera koštane pregradnje su u ovom istraživanju međutim pokazali drugačije vrijednosti. Naime, pokazali smo da bolesnici s hemofilijom imaju povišene vrijednosti markera koštane izgradnje, dok su s druge strane vrijednosti markera koštane razgradnje bile jednake onima u kontrolnoj skupini. Također, pokazali smo da na vrijednosti markera koštane pregradnje nije imala utjecaja težina hemofilije, prisutnost protutijela na FVIII i infekcija virusom hepatitisa C.

Prema našim rezultatima su vrijednosti biljega koštane izgradnje bili povišene u svih bolesnika s hemofilijom, neovisno o stupnju bolesti ili verificiranoj osteopeniji i osteoporozi. Nejasno je jesu li ovi markeri dovoljno osjetljivi pokazatelji koštane pregradnje u bolesnika s hemofilijom. Možemo pretpostaviti da bi povišene vrijednosti koštane alkalne fosfataze i osteokalcina mogle biti rezultat lokalnih zbivanja na razini zglobova.

Patofiziologija nastanka artropatije u bolesnika s hemofilijom nije do kraja razjašnjena. Vjeruje se da je etiologija oštećenja zglobova multifaktorijska, te da centralnu ulogu ima odlaganje željeza u zglobove (Lafeber, 2008.). Rane promjene u zglobovima se javljaju paralelno i neovisno jedna o drugoj u zglobnoj hrskavici, sinoviji i kosti (Roosendaal, 1998.). Željezo u zglobovima potiče apoptozu hondrocita, te utječe na sintezu i metabolizam proteoglikana, jednog od proteina matriksa hrskavice. Paralelno, željezo potiče proliferaciju stanica sinovijalne membrane indukcijom proto-onkogena, te potiče upalnu reakciju stimulacijom upalnih citokina. Posljedica je hipertrofična sinovijalna membrana, s depozitima hemosiderina, limfocitnom infiltracijom i pojačanom vaskularizacijom (Dunn, 2011., Lafeber, 2008.). Tijekom ovih procesa dolazi do otpuštanja brojnih upalnih citokina, IL-6, IL-1 α , TNF α koji mogu, uz ostale stanice, aktivirati i osteoklaste (Valentino, 2007.). Smatra se da hemofilična artropatija ima patogenezu sličnu reumatskom artitisu gdje je pokazano da upalni citokini s aktivacijom RANK/RANKL/OPG sustava induciraju

diferencijaciju i aktivnost osteoklasta (Hoots, 2006., Page, 2005., Manolagas, 1995.). Katsarou međutim nije pronašla povišene vrijednosti RANKL i OPG u bolesnika s teškom hemofilijom, što sugerira da serumske vrijednosti sRANKL/OPG nisu točan pokazatelj promjena u mikrookolišu zgloba koje mogu dovesti do gubitka kosti (Katsarou, 2009).

Patogeneza nastanka smanjene mineralne gustoće kosti u bolesnika s hemofilijom ostaje i dalje nejasna. Obzirom na oprečne rezultate dobivene ispitivanjem markera koštane pregradnje na ukupno relativno malom broju bolesnika s hemofilijom, bit će potrebna dodatna ispitivanja koja će točnije opisati mehanizam aktivacije osteoklasta i osteoblasta i njihov utjecaj na gubitak mineralne gustoće kosti u odrasloj dobi.

ZAKLJUČCI

1. Bolesnici s hemofilijom imaju značajno nižu mineralnu gustoću kosti u usporedbi sa zdravom populacijom, te imaju povišen rizik razvoja osteoporoze i osteopenije.
2. Mineralna gustoća kortikalne kosti u bolesnika s hemofilijom ovisi o stupnju težine bolesti. Bolesnici s teškim oblikom hemofilije imaju nižu mineralnu gustoću kortikalne kosti u odnosu na bolesnike s umjerenim i blagim oblikom hemofilije. Mineralna gustoća trabekularne kosti se ne razlikuje između bolesnika s teškim i u bolesnika s umjerenim i blagim oblikom hemofilije.
3. Prisutnost protutijela na faktor VIII u bolesnika s teškom hemofilijom ne povećava dodatno rizik smanjenja mineralne gustoće kosti.
4. Infekcija virusom hepatitisa C u bolesnika s hemofilijom ne povećava dodatno rizik nastanka smanjene mineralne gustoće kosti. Međutim, infekcija virusom hepatitisa C u bolesnika s umjerenim i blagim oblikom hemofilije pokazuje utjecaj na mineralnu gustoću kortikalne kosti, iako statistički graničnog značaja.
5. Hemofilija ima značajan negativan utjecaj na kvalitetu kosti mjerenu kvantitativnim ultrazvukom petne kosti. Bolesnici s teškim oblikom hemofilije imaju značajno niže parametre kvantitativnog ultrazvuka u odnosu na bolesnike s umjerenim i blagim oblikom bolesti. Prisutnost protutijela na faktor VIII i infekcija virusom hepatitisa C u bolesnika s hemofilijom nema utjecaja na kvalitetu kosti mjerenu kvantitativni ultrazvukom petne kosti.
6. Bolesnici s hemofilijom imaju značajno bržu koštanu pregradnju u odnosu na zdrave ispitanike iste dobi što se očituje statistički značajno višim vrijednostima serumskih biljega koštane izgradnje. Vrijednosti biljega koštane pregradnje ne ovise stupnju hemofilije, kao niti o prisutnosti protutijela na faktor VIII ili infekciju virusom hepatitisa C.
7. Metoda kvantitativnog ultrazvuka petne kosti je nakon modifikacije T-vrijednosti u definiranju osteopenije i osteoporoze pokazala relativno visoku

osjetljivost i specifičnost u otkrivanju smanjene mineralne gustoće kosti u bolesnika s hemofilijom.

SAŽETAK

Hemofilija je rijetka nasljedna bolest koju karakterizira sklonost prema spontanim krvarenjima u mišiće i zglobove, s posljedičnim razvojem hemofilične artropatije i invalidnosti. Ovo istraživanje smo proveli s ciljem procjene koštanog statusa i dinamike koštane pregradnje u bolesnika s hemofilijom, te procjene rizičnih faktora koji mogu utjecati na razvoj smanjene mineralne gustoće kosti.

Istraživanjem smo obradili 58 bolesnika s teškom, umjerenom i blagom hemofilijom A, te jednog bolesnika s hemofilijom B. U svrhu procjene koštanog statusa bolesnicima je učinjeno mjerenje mineralne gustoće kosti metodom denzitometrije i metodom kvantitativnog ultrazvuka petne kosti. Procjena dinamike koštane pregradnje je učinjena određivanjem markera koštane izgradnje (osteokalcina i koštane alkalne fosfataze) i markera koštane razgradnje (β -crosslaps). U svrhu procjene rizičnih faktora bolesnicima je učinjen serološki status infekcije virusom hepatitisa C, određena prisutnost protutijela na FVIII te zabilježen broj ciljnih zglobova. Među bolesnicima s hemofilijom je urednu mineralnu gustoću kosti imalo 43% bolesnika, osteopeniju 48%, a osteoporozu 9% bolesnika. Mineralna gustoća kosti je bila značajno snižena u bolesnika s hemofilijom u usporedbi sa zdravim kontrolama ($p=0,002$), te nije ovisila o prisutnosti protutijela na VIII, infekciji virusom hepatitisa C niti broju ciljnih zglobova. Mjereno kvantitativni ultrazvukom petne kosti, bolesnici s hemofilijom su imali značajno niže vrijednosti parametara QUI, BUA i SOS u usporedbi sa zdravim kontrolama ($p>0,000$). Ove vrijednosti su ovisile o težini hemofilije ($p=0,001$) i broju zahvaćenih ciljnih zglobova, ali ne i o prisutnosti protutijela na FVIII ili infekciji virusom hepatitisa C.

Ovim smo istraživanjem pokazali da bolesnici koju boluju od hemofilije imaju visoki rizik nastanka osteopenije i osteoporoze. Rizik smanjenja mineralne gustoće kosti ovisi o težini hemofilije, te ne ovisi o prisutnosti protutijela na faktor VIII niti o infekciji virusom hepatitisa C. Metoda kvantitativnog ultrazvuka petne kosti je nakon modifikacije prijelomne T-vrijednosti za definiciju osteopenije i osteoporoze

pokazala visoku osjetljivost i specifičnost u otkrivanju smanjene mineralne gustoće kosti u bolesnika s hemofilijom.

SUMMARY

Hemophilia is a rare inherited disorder characterized by spontaneous bleedings into joints and muscles, with development of a typical hemophilic arthropathy. Several studies have shown that patients with hemophilia have reduced bone mineral density, but the etiology is unclear. We evaluated the incidence of osteoporosis and investigated possible risk factors for development of reduced mineral bone density in hemophilia patients.

We evaluated 58 patients with severe, mild and moderate hemophilia A and B. Bone mineral density was measured with dual-energy X-ray absorptiometry and quantitative ultrasound of the heel. Bone turnover was evaluated by the measurement of bone formation markers (osteocalcin and bone alkaline phosphatase) and bone resorption markers (C-terminal cross-linking telopeptide of collagen type I). Infection with hepatitis B virus, verification of FVIII inhibitors and number of target joint were used for assessment of risk factors.

Out of 58 patients with hemophilia 48% had normal bone mineral density, 48% osteopenia and 9% osteoporosis. The severity of osteoporosis on femoral neck correlated with severity of hemophilia. No correlation was found between bone mineral density and number of target joints, infection with hepatitis C or presence of FVIII inhibitors. When assessed with quantitative ultrasound of the heel, patients with hemophilia has significantly lower levels of QUS parameters when compared to healthy controls ($p < 0,000$). The QUS values significantly correlated with severity of hemophilia and number of target joints, but no correlation was found in comparison with presence of FVIII inhibitors or infection of hepatitis C virus.

Our results showed that patients with hemophilia have high risk of developing osteoporosis and osteopenia, which is dependent on severity of hemophilia, but not on presence of FVIII inhibitors or hepatitis C infection. Quantitative ultrasound of the heel, after modification of T- cut off values, showed high sensitivity and specificity for detection of reduced bone mineral density in hemophilia patients.

LITERATURA

1. Abdelrazik, N., El-Ziny, M., Rabea, H. »Evaluation of bone mineral density in children with hemophilia: Mansoura University children hospital (MUCH) experience, Mansoura, Egypt.« *Hematology*, 2007.: Oct;12(5): 431-7.
2. Ananyeva, A., Lee, T., Jain, N., et al. »Inhibitors in Hemophilia A: Advances in Elucidation of Inhibitory Mechanisms and Inhibitor Management with Bypassing Agents.« *Semin Thromb Hemost.*, 2009.: 35:735-751.
3. Astermark J., Keith Hoots W. »Clinical issues in inhibitors.« *Haemophilia*, 2010.: Jul;16 Suppl 5: 54-60.
4. Astermark, J., Donfield, S.M., Gringeri, A., et al. »A randomised comparison of bypassing agents in hemophilia complicated by an inhibitor: the FEIBA NovoSeven Comparative (FENOC) Study.« *Blood*, 2007.: 109:546-51.
5. Barnes, C., Egan B, Speller T, Cameron F, Jones G, Ekert H, Monagle P. »Reduced bone density among children with severe hemophilia.« *Pediatrics*, 2004.: Aug;114(2): e177-81.
6. Bauer, D., Genant H.K, Stone K. »Fracture Intervention Trial Research Group. Quantitative ultrasound and vertebral fracture in postmenopausal women.« *J Bone Miner Res.*, 1995.: 10:353-358.
7. Berntorp, E, de Moerloose P, Ljung RC. The role of prophylaxis in bleeding disorders. *Haemophilia* 2010 Jul;16 Suppl 5:189-93.
8. Bolton-Maggs, P. »Haemophilia A and B.« *Lancet*, 2003.: 361: 1801-1809.
9. Burnouf, T. »Reducing the risk of infection from plasma products: specific preventative strategies.« *Blood Rev.*, 2000.: Jun;14(2):94-110.
10. Christoforidis, A., Economou, M., Farmaki, E., et al. »Increased osteoclastic activity as shown by increased sRANK-L/OPG ratio in boys with hemophilia.« *Ann Hematol.*, 2010.: Aug;89(8):837-8.
11. Christoforidis, A., Economou, M., Papadopoulou, E., et al. »Comparative study of dual energy X-ray absorptiometry and quantitative ultrasonography with the use of biochemical markers of bone turnover in boys with haemophilia.« *Haemophilia*, 2011.: Jan;17(1):e217-22.
12. Christoforidis, A., Economou, M., Papandoulou, E., et al. »Bone Status of Children With Hemophilia A Assessed With Quantitative Ultrasound Sonography (QUS) and Dual Energy X-ray Absorptiometry (DXA).« *J Pediatr Hematol Oncol.*, 2010.: 1-4.

13. Coppola, A., Santoro, C., Tagliaferri, A., et al. »Understanding inhibitor development in haemophilia A: towards clinical prediction and prevention strategies.« *Haemophilia*, 2010.: Jan;16 Suppl 1:13-9.
14. De Brasi, C.D., Bowen, D.J. »Molecular characteristics of the intron 22 homologs of the coagulation factor VIII gene: an update.« *J Thromb Haemost.*, 2008. Oct;6(10):1822-4.
15. DiMichele, D.M. »Inhibitors: resolving diagnostic and therapeutic dilemmas.« *Haemophilia*, 2002.: 8(280-287.).
16. DiMichele, D.M., Hoots, W.K., Pipe, S.W., et al. »International Workshop on immune tolerance induction: consensus recommendations.« *Haemophilia*, 2007.: (13 Suppl 1): 1-22.
17. Dolan, G. »The challenge of an ageing haemophilic population.« *Haemophilia*, 2010: Jul;16 Suppl 5:11-6.
18. Ducy, P., Schinke, T., et al. »The Osteoblast: A Sophisticated Fibroblast under Central Surveillance.« *Science*, 2000.: 289(5484): 1501-1504.
19. Dunn, A.L. »Pathophysiology, diagnosis and prevention of arthropathy in patients with haemophilia.« *Haemophilia*, 2011.: 1-8.
20. D'Young, A.I. »Conservative physiotherapeutic management of chronic haematomata and haemophilic pseudotumours: case study and comparison to historical management.« *Haemophilia*, 2009: Jan;15(1):253-60.
21. Fang, H., Wang, L., Wang, H. »The protein structure and effect of factor VIII.« *Thromb Res.*, 2007.: 119(1):1-13.
22. Franchini, M., Manzato, F., Salvagno, G.L., et al. »Prophylaxis in Congenital Hemophilia with Inhibitors: The Role of Recombinant Activated Factor VII.« *Semin Thromb Hemost.*, 2009.: 35:814-819.
23. Gallacher, S., Deighan, C., Wallace, A.M., et al. »Association of severe haemophilia A with osteoporosis: a densitometric and biochemical study.« *Quarterly Journal of Medicine*, 1994.: 87:181-186.
24. Gerstner, G. D. M., Tom, A., Worman, C., Schultz, W., Recht, M., Stopeck, A.T. »Prevalence and risk factors associated with decreased bone mineral density in patients with haemophilia.« *Haemophilia*, 2009.: Mar;15(2): 559-65.
25. Gosh, K., Madkaikar, M., Jijina F. »Fractures of long bones in severe haemophilia.« *Haemophilia*, 2007.: 13, 337–339.

26. Frost, M.L., Blake, G.M., Fogelman, I. »Can the WHO criteria for diagnosing osteoporosis be applied to calcaneal quantitative ultrasound? « *Osteoporos Int.* 2000;11(4):321-30.
27. Hampshire, DJ., Goodeve AC. »Haemophilia A and von Willebrand's disease.« *Haematologica*, 2011.; Jun;96(6):798-800.
28. Hans, D., Schott A.M., et al. »Ultrasonographic heel measurement to predict hip fracture in elderly women: the EPIDOS prospective study.« *Lancet*, 1996.: 348:5511-5514.
29. Hilberg, T. »Cross sectional study to investigate the influence of treatment regimes on the development of haemophilic arthropathy.« *Hamostaseologie*, 2009.: Oct;29 Suppl 1: S77-9.
30. Hilberg, T., Herbsleb, M., Puta, C. et al. »Physical training increases isometric muscular strength and proprioceptive performance in hemophilic subjects.« *Haemophilia*, 2003.: 9: 86-93.
31. Hoots, W.K. »Pathogenesis of hemophilic arthropathy.« *Semin Hematol.*, 2006.: Jan;43(1 Suppl 1):S18-22.
32. Iida T, Chikamura C, A.S., et al. »A study on the validity of quantitative ultrasonic measurement used the bone mineral density values on dual-energy X-ray absorptiometry in young and in middle-aged or older women«. *Radiol Phys Technol.* 2010 Jul;3(2):113-9.
33. Johansen, A., Stone, M.D. »The effect of ankle oedema on bone ultrasound assessment at the heel.« *Osteoporos Int.*, 1997.: 7(1):44-7.
34. Jorquera, JI. »Safety procedures of coagulation factors.« *Haemophilia*, 2007.: Dec;13 Suppl 5:41-6.
35. Kasper, C.K. »Concentrate safety and efficacy.« *Haemophilia*, 2002.: May;8(3):161-5.
36. Kastelan, D., Kujundzic-Tiljak, M., Kraljevic, I., Kardum, I., Giljevic, Z., Korsic, M. »Calcaneus ultrasound in males: normative data in the Croatian population (ECUM study).« *J Endocrinol Invest.*, 2006.: Mar;29(3):221-5.
37. Katsarou O, T. E., Chatzismalis Provelengios, S., Adraktas, T., Hadjidakis, D., Kouramba, A., Karafoulidou, A. »Increased bone resorption is implicated in the pathogenesis of bone loss in hemophiliacs: correlations with hemophilic arthropathy and HIV.« *Ann Hematol.*, 2009.: Jun 2.
38. Kelley, G., Zung vu Tran. »Exercise and bone mineral density in men: a meta-analysis.« *J Appl Physiol.*, 2000.: 88: 1730-1736.

39. Kerr, C. »Genetics of human blood coagulation.« *J Med Genet*, 1965.: 2: 221-308.
40. Khaw, K.T., Reeve, J., Luben, R., et al. »Prediction of total and hip fracture risk in men and woman by quantitative ultrasound of the calcaneus: EPIC-Norfolk prospective population study.« *Lancet*, 2004.: 363:197-202.
41. Khawaji, M., Berntorp, E. »Long-term prophylaxis in severe haemophilia seems to preserve bone mineral density.« *Haemophilia*, 2009.: Jan;15(1): 261-6.
42. Khawaji, M., Akesson, K., Berntorp, E. »Physical activity for prevention of osteoporosis in patients with severe haemophilia on long-term prophylaxis.« *Haemophilia*, 2010.: 1-7.
43. Khawaji, M., Astermark, J., Von Mackensen, S., et al. »Bone density and health-related quality of life in adult patients with severe haemophilia.« *Haemophilia*, 2011.: Mar;17(2):304-11.
44. Klamroth, R., Pollmann, H., Hermans, C., et al. »The relative burden of haemophilia A and the impact of target joint development on health-related quality of life: results from the ADVATE Post-Authorisation Safety Surveillance (PASS) Study.« *Haemophilia*, 2011.: 17; 412-421.
45. Kohrt, W.M., Little, K.D., Nelson, M.E., Yingling, V.R. »American College of Sports Medicine Position Stand: physical activity and bone health. Med Sci Sports Exerc.« *American College of Sports Medicine*, 2004.: Nov;36(11): 1985-96.
46. Konkle, B. »Clinical challenges within the ageing hemophilia population.« *Thrombosis Research*, 2011.: S10-S13.
47. Kovacs, C. »Hemophilia, low bone mass, and osteopenia/osteoporosis.« *Transfusion and Apheresis Science*, 2008.: 38:33-40.
48. Kriemler, S., Zahner, L., Puder, J., et al. »Weight-bearing bones are more sensitive to physical exercise in boys than in girls during pre- and early puberty: a cross-sectional study.« *Osteoporos Int.*, 2008.: Dec;19(12):1749-58.
49. Lafeber, F.P., Valentino, L.A. »Physiopathology of haemophilic arthropathy.« *Haemophilia*, 2008.: Jul;14 Suppl 4.
50. Lambing, A., Kachalsky, E., Kuriakose, P. »Liver transplantation in the haemophilia patient.« *Haemophilia*, 2011 Apr.

51. Lewis, J.H., Bontempo, F.A., Spero, JA, et al. »Liver transplantation in a hemophiliac.« *N Engl J Med.*, 1985.: May 2;312(18):1189-90.
52. Lillicrap, D. »The molecular basis of haemophilia B.« *Haemophilia*, 1998.: Jul;4(4):350-7.
53. Manco-Johnson, M.J., Abshire, T.C., Shapiro, A.D., et al. »Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe hemophilia« *N Engl J Med.* 2007: Aug 9;357(6):535-44.
54. Mannucci. » Hemophilia and related bleeding disorders: a story of dismay and success.« *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.*, 2002.
55. Manolagas, S.C., Jilka, R.L. »Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis.« *N Engl J Med.*, 1995.: Feb 2;332(5):305-11.
56. Mansouritorghabeh, H., Badieli, Z. »Are individuals with severe haemophilia A prone to reduced bone density?« *Rheumatol Int.*, 2008.: Sep;28(11):1079-83.
57. Marin, F., Gonzales-Macias, J., Diez-Perez, A., et al. »Relationship Between Bone Quantitative Ultrasound and Fractures: A Meta-Analysis.« *Journal of bone and mineral research*, 2006.: 21: 1126-1135.
58. Morfini, M., Haya, S., Tagariello, G., et al. »European study on orthopaedic status of haemophilia patients with inhibitors.« *Haemophilia*, 2007.: Sep;13(5):606-12.
59. Nair, A.P., Ghosh, K., Madkaikar, M., Shrikhande, M., Nema, M. »Osteoporosis in young haemophiliacs from western India.« *Am J Hematol.*, 2007.: Jun;82(6): 453-7.
60. Nelson, M.E, Yingling, V.R. »Kohrt WM, B. S., Little KD American College of Sports Medicine Position Stand: physical activity and bone health. Med Sci Sports Exerc.« *American College of Sports Medicine*, 2004.: Nov;36(11): 1985-96.
61. Nilsson, I.M.; Berntorp, E., Lofqvist, T., et al. »Twenty-five years' experience of prophylactic treatment in severe haemophilia A and B.« *J Intern Med.*, 1992.: 232: 25-32.
62. Nowak-Gottl, U., Kurnik, K., et al. »Haemophilia and thrombophilia: What do we learn about combined inheritance of both genetic variations?« *Haemostaseologie*, 2003.: 23(1): 36-40.

63. Olsson, R., Johansson, C., Lindstedt, G., et al. »Risk factors for bone loss in chronic active hepatitis and primary biliary cirrhosis.« *Scand J Gastroenterol.*, 1994.: 29:753-756.
64. Oyesiku, J.O. »Home treatment of haemophilia patients with inhibitors.« *Haemophilia*, 2011.: Mar;17(2):173-8.
65. Page, G., Miossec, P. »RANK and RANKL expression as markers of dendritic cell-T cell interactions in paired samples of rheumatoid synovium and lymph nodes.« *Arthritis Rheum.*, 2005.: Aug;52(8):2307-12.
66. Patel, H., Heathcote, E.J. »When to treat and the benefits of treating hepatitis C in patients with haemophilia.« *Haemophilia*, 2009.: Jan;15(1):20-32.
67. Pettersson, H. »Can joint damage be quantified?« *Semin Hematol.*, 1994.: 31 (Suppl 2). 1-4.
68. Peyvandi, F., Jayandharan, G., Chandy, M., et al. »Genetic diagnosis of haemophilia and other inherited bleeding disorders.« *Haemophilia*, 2006.: Jul;12 Suppl 3:82-9.
69. Philipp, C. »The Ageing Patient with Hemophilia: Complications, Comorbidities, and Management Issues.« *Hematology*, 2010.: 191-196.
70. Prins, Jorgensen, Jorgensen, Hassager. »The role of quantitative ultrasound in the assessment of bone: a review.« *Clinical Physiology*, 1998.: 18(1), 3-17.
71. Ragni, M.V., Jordan, J.A. »Viral pathogens.« *Haemophilia*, 2010.: Jul;16 Suppl 5: 40-6.
72. Rodriguez-Merchan, E.C. »Bone fractures in the haemophilic patient.« *Haemophilia*, 2002.: 8, 104–111.
73. Rodriguez-Merchan, E. »Orthopaedic assessment in haemophilia.« *Haemophilia*, 2003.: 9 (Suppl 1). 65-74.
74. Roosendaal, G., Mauser-Bunschoten, E.P., De Kleijn, P., et al. »Synovium in haemophilic arthropathy.« *Haemophilia*, 1998.: jul;4(4):502-5.
75. Rossbach, H.C. »Review of antihemophilia factor injection for the routine prophylaxis of bleeding episodes and risk of joint damage in severe hemophilia A.« *Vascular Health and Risk Management*, 2010.: 6: 59-68.
76. Schiefke, I., Fach, A., Wiedmann, M., et al. »Reduced bone mineral density and altered bone turnover markers in patients with non-cirrhotic hepatitis B or C infection.« *World J Gastroenterol.*, 2005.: 11:1843-1847.

77. Seeman, E. »Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility.« *N Engl J Med.*, 2006.: May 25;354(21): 2250-61.
78. Seligsohn, U. »High gene frequency of factor XI (PTA) deficiency in Ashkenazi-Jews.« *Blood*, 1978.: 51:1223.
79. Shetty, S., Bhav, M., Ghosh, K. »Challenges of multiple mutations in individual patients with haemophilia.« *Eur J Haematol.*, 2011.: Mar;86(3):185-90.
80. Siboni, S.M., Mannuci, P.M., Gringeri, A. et al. »Health status and quality of life of elderly persons with severe haemophilia born before the advent of modern replacement therapy.« *J Thromb Haemost.*, 2009.: 7: 780-6.
81. Soucie, J.M., Cianfrini, C, et al. »Joint range-of-motion limitations among young males with hemophilia: prevalence and risk factors.« *Blood*, 2004.: Apr 1;103(7):2467-73.
82. Staa, T.P.V., Laan, R.F, Barton, I.P, Cohen, S., Reid, D.M., Cooper, C. »Bone density threshold and other predictors of vertebral fracture in patients receiving oral glucocorticoid therapy.« *Arthritis and Rheumatism*, 2003.: 48:3224-3229.
83. Street, A., Sussex, B., Warners, M., et al. »Haemophilia and ageing.« *Haemophilia*, 2006.: 12 (Suppl. 3): 8-12.
84. Teitel, J.M. » Home management of haemophilia.« *Haemophilia*, 2004.: 10(2): 118-33.
85. Teitel J.M, Israels, S., Lillicrap, D., Poon, M.C., Sek, J. »Home management of haemophilia.« *Haemophilia*, 2004.: 10(2): 118-33.
86. Teitel, J., Berntorp, E., Collins, P., et al. »A systematic approach to controlling problem bleeds in patients with severe congenital haemophilia A and high-titre inhibitors.« *Haemophilia*, 2007.: May;13(3):256-63.
87. Teitelbaum, S. L. »Bone Resorption by Osteoclasts.« *Science*, 2000.: 289(5484): 1504-1508.
88. Tlacuilo-Parra A, Morales-Zambrano, R., Tostado-Rabago, N., Esparza-Flores, M.A., Lopez-Guido, B., Orozco-Alcala, J. »Inactivity is a risk factor for low bone mineral density among haemophilic children.« *Br J Haematol.*, 2008.: Mar;140(5): 562-7.
89. Tlacuilo-Parra, A., Villela-Rodríguez, J., Garibaldi-Covarrubias, R., et al. »Bone turnover markers and bone mineral density in children with haemophilia.« *Haemophilia*, 2010.: Dec 1.

90. Toyras, J., Kroger, H., Jurvelin, J.S. »Bone Properties As Estimated by Mineral Density, Ultrasound Attenuation, and Velocity.« *Bone*, 1999.: 25:725-731.
91. Treur, M.J., McCracken, F., Heeg, B., et al. »Efficacy of recombinant activated factor VII vs. activated prothrombin complex concentrate for patients suffering from haemophilia complicated with inhibitors: a Bayesian meta-regression.« *Haemophilia*, 2009.: 15, 420-436.
92. Tsuneoka, K., Tameda, Y., Takase, K., et al. »Osteodystrophy in patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis.« *J Gastroenterol.*, 1996.: 31:669-678.
93. Valentino, L.A., Hakobyan, N., Rodriguez, N., Hoots, W.K. »Pathogenesis of haemophilic synovitis: experimental studies on blood-induced joint damage.« *Haemophilia*, 2007.: Nov;13 Suppl 3:10-3.
94. Wallny, T.A., Scholz, D.T., Oldenburg, J., Nicolay, C., Ezziddin, S., Pennekamp, P.H., Stoffel-Wagner, B., Kraft, C.N. »Osteoporosis in haemophilia - an underestimated comorbidity?« *Haemophilia*, 2007.: Jan;13(1): 79-84.
95. White, G.C., Rosendaal, F., Aledort, L.M., et al. »Definitions in hemophilia. Classification of the severity of hemophilia. On behalf of the Factor VIII and Factor IX Subcommittee of the International Society on Thrombosis and Hemostasis« 2000.
96. Wilde, J., Teixeira, P., Bramhall, S.R., et al. »Liver transplantation in haemophilia.« *Br J Haematol.*, 2002.: Jun;117(4):952-6.
97. Young, G., Shafer, F.E., Rojas, P., et al. »Single 270 mcg kg(-1)-dose rFVIIa vs. standard 90 mcg kg(-1)-dose rFVIIa and APCC for home treatment of joint bleeds in haemophilia patients with inhibitors: a randomised comparison.« *Haemophilia*, 2008.: 14:287-94.
98. Zouch, M., Jaffré, C., Thomas, T., et al. »Long-term soccer practice increases bone mineral content gain in prepubescent boys.« *Joint Bone Spine.*, 2008.: Jan;75(1):41-9.
99. Salek, Z.S., Benson, G.M., Elezovic, I. et al. »The need for speed in the management of haemophilia patients with inhibitors.« *Haemophilia*, 2011.: 17: 95-102.

ŽIVOTOPIS

Ana Boban, dr. med, je rođena 25.11.1977. godine u Zagrebu, gdje je i maturirala 1996. godine u II gimnaziji i u glazbenoj školi „Pavla Markovca“, smjer glazbenik flautist. U lipnju 2002. godine je diplomirala na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 2003. godine je znanstveni novak-asistent na Katedri za unutarnje bolesti Medicinskog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof dr sc Borisa Labara. Iste godine upisuje poslijediplomski studij „Biomedicina i zdravstvo“ na Medicinskog fakultetu u Zagrebu. Od 2004. do 2008. godine radi kao specijalizant interne medicine u Kliničkom bolničkom centru Zagreb, te u studenom 2008. polaže specijalistički ispit.

Trenutno radi kao specijalist internist u Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Od listopada 2009. je na subspecijalizaciji iz hematologije. Njeno područje interesa su hemofilija i poremećaji zgrušavanja. Sudjeluje u radu znanstvenih projekata „Dijagnostika i terapija poremećaja hemostaze“ voditeljice prof. dr. sc. Silve Zupančić-Šalek, te „Leukemije i transplantacija matičnih krvotvornih stanica“ voditelja prof. dr. sc. Borisa Labara. Također sudjeluje u nastavi, kao voditelj vježbi predmeta „Propedeutika“, voditelj vježbi i seminara iz predmeta „Interna medicina“, te modula „Hitna stanja u medicini“ i „Kliničko prosuđivanje“.

Do sada je objavila tri znanstveno-stručna rada, od kojih su dva objavljena u časopisima indeksiranim u Current Contestu, te je koautor poglavlja u dva udžbenika.

DODATAK 1.

Upitnik o samostalnoj procjeni razine fizičke aktivnosti.

Razina aktivnosti na temelju osobne procjene	
Nesmetano obavljanje obaveza u školi/na poslu, slobodne aktivnosti bez ograničenja	5
Nesmetano obavljanje obaveza u školi/na poslu, ograničene slobodne aktivnosti zbog boli, slabosti ili ograničenih pokreta u zglobovima.	4
Ograničeno obavljanje obaveza u školi/na poslu i slobodnih aktivnosti zbog boli, slabosti ili ograničenih pokreta u zglobovima.	3
Ograničeno obavljanje obaveza u školi/na poslu i slobodnih aktivnosti, te ograničenje u provođenju osobne higijene i osobnih potreba, zbog boli, slabosti ili ograničenih pokreta u zglobovima.	2
Zahtjeva pomoć drugih osoba u provođenju osobne higijene i osobnih potreba, također pomoć u obavljanju obaveza u školi ili na poslu, sudjelovanje u slobodnim aktivnostima nije moguće.	1